

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Mgr. Petr Kozlík

Moderní trendy ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii a jejich aplikace

Modern Trends in High Performance Liquid Chromatography and Their
Application

Dizertační práce

Vedoucí disertační práce: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 6. 2014

Podpis

Tato dizertační práce vznikla na základě výsledků získaných v letech 2010 až 2014 během mého Ph.D. studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 43, Praha 2.

Tato dizertační práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt 1M06011, 285411, MSM0021620857), Grantové agentury České republiky (projekt P505/11/1459), Grantové agentury Karlovy Univerzity v Praze (projekt 356411, 18213, SVV, UNCE) a KONTAKTAM 2010 (projekt LH11018).

Školitel: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.
Katedra analytické chemie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Školitel-konzultant: Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Tato dizertační práce je založena na následujících čtyřech vědeckých pracích, které byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech:

1. **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.; Tesařová, E.; Coufal, P.; Čabala, R.: *Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples*; J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2127-2132.
2. **Kozlík, P.**; Šimová, V.; Kalíková, K.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: *Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases*; J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65.
3. Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Gilar, M.; Tesařová, E.: *Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns*; J. Sep. Sci 36 (2013) 2421-2429.
4. **Kozlík, P.**; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bosáková, Z.: *Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection applied for analysis of pteridines in two Graphosoma species (Insecta: Heteroptera)*; J. Chromatogr. B 930 (2013) 82-89.

PROHLÁŠENÍ O SPOLUAUTORSTVÍ

Jako zástupce spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Petr Kozlík podílel na níže uvedených publikovaných pracích měrou uvedenou v závorkách:

1. **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.; Tesařová, E.; Coufal, P.; Čabala, R.: *Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples*; J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2127-2132. (podíl 80 %)
2. **Kozlík, P.**; Šímová, V.; Kalíková, K.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: *Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases*; J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65. (podíl 70 %)
3. Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Gilar, M.; Tesařová, E.: *Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns*; J. Sep. Sci 36 (2013) 2421-2429. (podíl 55 %)
4. **Kozlík, P.**; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bosáková, Z.: *Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection applied for analysis of pteridines in two Graphosoma species (Insecta: Heteroptera)*; J. Chromatogr. B 930 (2013) 82-89. (podíl 75 %)

.....
Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

.....
Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

.....
RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Předmětová hesla

Analytická chemie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Klíčová slova

Tandemová hmotnostní spektrometrie, kapilární kapalinová chromatografie, estrogenní polutanty, hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, charakterizace separačních systémů, model lineárních vztahů volných energií, pteriny, *Graphosoma lineatum*, *Graphosoma semipunctatum*

Subject words

Analytical chemistry, high performance liquid chromatography

Key words

Tandem mass spectrometry, capillary liquid chromatography, estrogenic pollutants, hydrophilic interaction liquid chromatography, characterization of separation systems, linear free energy relationship, pterines, *Graphosoma lineatum*, *Graphosoma semipunctatum*

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. a školitelce-konzultantce Prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za věcné připomínky, návrhy, rady, diskuzi a podporu během celé dizertační práce. Velké díky patří RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D. za ochotu, pomoc a celkově velmi příjemnou spolupráci během mého Ph.D. studia. Rád bych také poděkoval všem členům Katedry analytické chemie za příjemné pracovní a přátelské prostředí.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni za podporu a trpělivost, kterou mi věnovali.

ABSTRAKT (CZ)

Dizertační práce se zabývá významnými trendy ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Jedním z těchto trendů je miniaturizace separačních systémů ve spojení s vysokou citlivostí detekce nebo charakterizace a aplikace nových typů stacionárních fází pro separaci polárních látek v systémech vhodných pro hmotnostní detekci, tedy stacionárních fází pro hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii (HILIC).

Pro stanovení pěti estrogenních polutantů ve vzorcích vod byla vyvinuta miniaturizovaná metoda, tedy metoda kapilární kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (cLC-MS/MS). Bylo testováno několik nových sorpčních materiálů pro extrakci tuhou fází (SPE) s ohledem na výtěžnost extrakce. Nejlepší výtěžnosti (95 – 100 %) bylo dosaženo na kolonce Discovery DSC-18Lt. Optimalizovaná SPE-cLC-MS/MS metoda umožňuje stanovení jednotlivých estrogenů ve vzorcích vody v jednotkách až desítkách ng/l.

V HILIC módu byly charakterizovány a porovnány tři stacionární fáze - silikagelová, cyklofruktanová a isopropyl cyklofruktanová. Bylo zjištěno, že na cyklofruktanových stacionárních fázích se uplatňuje vodíková interakce a disperzní síly. U silikagelové fáze jsou tyto interakce méně významné. Ukázalo se, že modifikace silikagelu cyklofruktanem a derivatizovaným cyklofruktanem vede ke zlepšení selektivity stacionární fáze pro separaci pentapeptidů a nonapeptidů.

Byly porovnány dvě amidové kolony XBridge™ Amide a TSK gel Amide-80 v HILIC módu. Pro rozpoznání jednotlivých interakcí byly využity jak jednoduché chromatografické testy, tak model lineárních vztahů volných energií i některé nové přístupy charakterizace separačních systémů. Amidové kolony vykazovaly určité rozdíly v retenci, selektivitě i separační účinnosti.

Nová HILIC metoda s tandemovou hmotnostní spektrometrií byla vyvinuta pro analýzu vybraných polárních pterinů v kutikule ploštic. Za optimalizovaných separačních podmínek, ZIC-HILIC kolona, acetonitril/5 mM octan amonný, pH = 6,80, 85/15 (v/v), průtok mobilní fáze 0,6 ml/min a teplota kolony 30 °C, byly proměřeny extrakty kutikul ploštic druhů *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* a byl určen obsah jednotlivých pterinů.

ABSTRACT (EN)

The dissertation thesis is focused on major trends in high performance liquid chromatography such as miniaturization of separation systems in hyphenation with high-sensitivity detection or characterization of new types of stationary phases for the separation of polar compounds in systems suitable for mass detection. Application of recently developed stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is also considered.

Capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometry (cLC-MS/MS) method was developed for determination of five estrogenic pollutants in samples of water. Several new sorption materials for solid phase extraction (SPE) were compared to obtain sufficient recovery of all the tested analytes. Discovery DSC-18Lt column provided the highest recovery (95 – 100 %). The optimized cLC-MS/MS with SPE was used for determination of estrogens in water samples in the order of units to tens of ng/L.

HILIC separation systems with silica gel, cyclofructan and isopropyl cyclofructan modified silica stationary phases were tested and compared. Ability to donate protons and dispersion interactions are the main interactions that affect retention in HILIC with cyclofructan-based columns while they are less important in separation systems with bare silica stationary phase. Improved separation performance and selectivity of cyclofructan-based stationary phases, as compared with unmodified silica gel, for separation of peptides was demonstrated in HILIC.

Two amide-based HPLC columns XBridge™ Amide column and TSK gel Amide-80 column were characterized in detail and compared in HILIC mode. HPLC separation systems with amide-based columns were characterized by simple chromatographic tests, linear free energy relationship model (LFER) and newly designed approaches. The amide-based columns showed certain differences in retention, selectivity and efficiency.

A new separation method involving HILIC with tandem mass spectrometric detection was developed for the analysis of polar pterines in the integuments of heteropteran insect species. The optimized conditions for the separation of pterines consisted of ZIC-HILIC column and mobile phase composed of acetonitrile/5 mM ammonium acetate, pH 6.80, 85/15 (v/v), flow rate 0.6 mL/min and column temperature 30 °C. The method was applied to the analysis of pterines in the integuments of *Graphosoma lineatum* and *Graphosoma semipunctatum*.

OBSAH

ABSTRAKT (CZ)	7
ABSTRACT (EN).....	8
SEZNAM ZKRATEK A POUŽITÝCH SYMBOLŮ	11
1 ÚVOD	14
2 CÍLE PRÁCE	17
3 STANOVENÍ ESTROGENNÍCH POLUTANTŮ METODOU KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE.....	18
3.1 Teoretický úvod.....	18
3.1.1 Estrogenní látky v životním prostředí	18
3.1.2 Kapilární kapalinová chromatografie	21
3.1.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie – trojitý kvadrupól	22
3.1.4 Povrchově porézní částice	25
3.2 Výsledky a diskuse – komentář k publikaci.....	27
3.2.1 Vývoj metody kapilární kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí ke stanovení estrogenních látek ve vodách - Publikace I	27
3.3 Literatura I	31
PUBLIKACE I	35
4 HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE A CHARAKTERIZACE SEPARAČNÍCH SYSTÉMŮ	42
4.1 Teoretický úvod.....	42
4.1.1 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie	42
4.1.1.1 Mechanismus separace.....	43
4.1.1.2 Stacionární fáze.....	44
4.1.1.2.1 Noderivatizované silikagelové stacionární fáze.....	44
4.1.1.2.2 Cyklofruktanové stacionární fáze	45
4.1.1.2.3 Amidové stacionární fáze	47
4.1.1.2.4 Sulfoalkylbetainové stacionární fáze.....	49
4.1.2 Charakterizace separačních systémů	50
4.1.2.1 Modely lineárních vztahů volných energií	51
4.1.3 Pteriny	54

4.1.3.1 Chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti	54
4.1.3.2 Význam a funkce	55
4.1.3.3 Metody stanovení	56
4.2 Výsledky a diskuse – komentáře k publikacím	58
4.2.1 Porovnání vlastností silikagelové stacionární fáze a cyklofruktanových stacionárních fází v HILIC - Publikace II	58
4.2.2 Porovnání dvou amidových stacionárních fází v HILIC - Publikace III	63
4.2.3 Analýza pterinů v plošticích <i>Graphosoma lineatum</i> a <i>Graphosoma</i> <i>semipunctatum</i> pomocí HILIC-MS/MS - Publikace IV	67
4.3 Literatura II	71
PUBLIKACE II	79
PUBLIKACE III	88
PUBLIKACE IV	103
5 ZÁVĚR.....	113
SEZNAM PUBLIKACÍ	116
SEZNAM PŘEDNÁŠEK A PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ	118
PŘÍLOHA I	122
PŘÍLOHA II	127

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

BEH	bridged ethylene hybrid (hybridní sorbent)
C18	oktadecyl
CF	cyklofruktan
cLC	kapilární kapalinová chromatografie
ČOV	čistírna odpadních vod
E1	estron
E3	estriol
ED	endokrinní disruptory
EE2	17 α -ethynylestradiol
ELISA	enzymoimunoanalýza
FD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
GL	<i>Graphosoma lineatum</i>
GS	<i>Graphosoma semipunctatum</i>
HI	index hydrofobicity
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HLB	hydrofilní-lipofilní rovnováha (hydrophilic-lipophilic balanced)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IČ	infračervená spektroskopie
IT	iontová past
IT-TOF	iontová past-průletový analyzátor
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickým detektorem
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostně spektrometrickým detektorem
LFER	model lineárních vztahů volných energií
LIT	lineární iontová past

LIT-ICR	lineární iontová past-iontová cyklotronová rezonance
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
M	mestranol
MIP	molekulárně vtištěný polymer
MRM	multiple reaction monitoring (záznam vybraných přechodů mezi prekurzorovými a produktovými ionty)
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PCA	analýza hlavních komponent
q	kolizní cela
Q	kvadrupól
Q-ICR	kvadrupól-iontová cyklotronová rezonance
Q-IMS-TOF	kvadrupól-iontová mobilita-průletový analyzátor
Q-IT	kvadrupól-iontová past
QqQ	trojitý kvadrupól
QSAR	kvantitativní vztah mezi strukturou a účinností
QSRR	kvantitativní vztah mezi strukturou a retencí
Q-TOF	kvadrupól-průletový analyzátor
RIA	radioimunoanalýza
RP-HPLC	reverzní mód vysokoúčinné kapalinové chromatografie
SDB	styrendivinybenzen
SI	silanolový index
SIM	selected ion monitoring (záznam vybraného iontu)
SP	stacionární fáze
SPE	extrakce tuhou fází
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOF	průletový analyzátor
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
βE2	17β-estradiol

αE2	17 α -estradiol
a	regresní koeficient LFER rovnice
A	celková nebo efektivní acidita vodíkové vazby
b	regresní koeficient LFER rovnice
B	celková nebo efektivní bazicita vodíkové vazby
c	úsek v rovnici LFER
e	regresní koeficient LFER rovnice
E	rozsah molární refrakce
k	retenční faktor
m/z	poměr hmotnosti a náboje
s	regresní koeficient LFER rovnice
S	parametr dipolarity/polarizibility
v	regresní koeficient LFER rovnice
V	McGowanův charakteristický objem solutu

1 ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejčastěji používaných separačních technik. Mezi její hlavní výhody se řadí vysoká spolehlivost, dobrá opakovatelnost a v neposlední řadě její robustnost. Za posledních několik let došlo k podstatnému vývoji v HPLC, a to převážně z hlediska její instrumentace. Trendy ve vývoji HPLC sledují hlavně tyto cíle: zvýšení účinnosti a selektivity separačního procesu, zrychlení analýz, snížení spotřeby organických rozpouštědel a rozšíření aplikačních možností HPLC na co nejširší okruhy různých látek.

Mezi nejzásadnější trendy, které se ujaly v praxi, patří spojení HPLC s hmotnostně spektrometrickými (MS) detektory. HPLC s MS detekcí není nikterak novým počinem, ale obrovský instrumentální vývoj ve sprejovacích ionizačních technikách umožnil bezproblémové zavedení techniky HPLC-MS do rutinních laboratoří. Toto spojení významně zvyšuje selektivitu a citlivost stanovení. Díky MS detektoru jsme schopni získat cenné strukturní informace o látkách vyskytujících se ve vzorku. Spojení HPLC s MS má nezastupitelné místo v analýzách komplexních vzorků, jako jsou biologické a environmentální materiály [1]. HPLC-MS (nejlépe s tandemovým hmotnostním detektorem) je ideální technikou ke stopovým kvantitativním analýzám. V současné době, kdy se velmi dbá na kvalitu prostředí ve kterém žijeme, je pozornost věnována vývoji velmi citlivých a selektivních metod, které by byly schopny stanovit polutanty životního prostředí na koncentračních hladinách, ve kterých se tyto látky reálně vyskytují. Jednou z mnoha skupin látek, které se vyskytují v životním prostředí, jsou estrogenní látky [2]. Tyto sloučeniny patří do skupiny endokrinních disruptorů, které mohou určitým způsobem ovlivňovat hormonální soustavu živočichů [2]. Citlivé a selektivní analytické metody určené ke stanovení těchto látek jsou nutností pro účinné sledování jejich výskytu a koloběhu v životním prostředí, což pomůže získat důležité informace o jejich chování a způsobu odstranění ze životního prostředí.

Dalším patrným trendem v HPLC je tlak na obecné snížení spotřeby organických rozpouštědel. Klasická HPLC používá průtoky mobilní fáze běžně v rozmezí od 0,3 do

1,5 ml/min. Snížení spotřeby organických rozpouštědel je šetrnější k životnímu prostředí, což je v souladu s tzv. „zelenou chemií“. Do popředí se dostává kapilární kapalinová chromatografie (cLC), která používá průtoky mobilní fáze řádově v desítkách mikrolitrů za minutu. Výhoda cLC není jen ve snížení organického odpadu, ale také ve zvýšení účinnosti separace, v nižší spotřebě vzorku, což má význam hlavně u biologických vzorků, a v jednodušším spojení s hmotnostními detektory z důvodu nižších průtoků mobilní fáze [3]. Neméně významným trendem je používání stacionárních fází s částicemi menšími než 2 μm , u kterých se dosahuje vysoké účinnosti separací v podstatně kratším čase než u klasické HPLC, ale zároveň dochází k razantnímu navýšení tlaku v systému. Použití těchto kolon vyžaduje speciální instrumentaci, která je schopna těmto tlakům odolat. Pro kapalinovou chromatografii s těmito kolonami se používá označení ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC). Na poli stacionárních fází pro HPLC se stále častěji používají kolony s povrchově porézními částicemi. Tyto kolony poskytují srovnatelné účinnosti jako kolony s částicemi menšími než 2 μm , ale za podstatně nižších zpětných tlaků. Výhodou je, že se může používat klasická HPLC instrumentace.

Metoda HPLC je nejčastěji používána v reverzním chromatografickém módu, kdy stacionární fáze je méně polární než mobilní fáze. V tomto uspořádání jsou méně polární látky více zadržovány a více polární látky vykazují podstatně nižší retenci. Pro mnoho velmi polárních látek, jako jsou různé metabolity (deriváty aminokyselin, sacharidů, peptidů aj.) a další biologicky aktivní látky, je reverzní chromatografický systém často nevhodný. Některé analyty vykazují velmi nízkou retenci a separační systém má velmi špatnou selektivitu. Pro separaci takovýchto látek se úspěšně začala používat hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC), která vykazuje dostatečnou retenci a selektivitu pro polární látky a dobrou kompatibilitu s hmotnostním detektorem (použití těkavých pufrů a mobilních fází s vysokým obsahem organické složky) [4]. Nejpoužívanějšími stacionárními fázemi v HILIC jsou klasické silikagelové, amidové, diolové, aminové a zwitteriontové stacionární fáze [4]. Vývoj nových stacionárních fází s rozdílnou selektivitou pro použití v HILIC však stále pokračuje. Potenciálními adepty pro širší použití v HILIC se jeví stacionární fáze na bázi cyklofruktanů. Charakterizace kolon pro HILIC (nových i již běžně používaných) z

hlediska interakčních mechanismů, může pomoci jak při vývoji chromatografických metod, tak i při vývoji nových stacionárních fází.

Příkladem využití nových trendů kapalinové chromatografie, a to hydrofilní interakční kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií, pro konkrétní analýzu je v této práci stanovení polárních pterinů v plošticích *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum*.

2 CÍLE PRÁCE

Dizertační práci lze rozdělit do dvou částí, kdy společným jmenovatelem je studium a uplatnění moderních vývojových trendů v kapalinové chromatografii.

Cílem první části práce byl vývoj analytické metody využívající kapilární kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní detekcí ke stanovení vybraných estrogenních polutantů po extrakci tuhými fázemi.

Druhá část dizertační práce byla zaměřena na hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii. Dílčí cíle druhé části lze rozdělit do několika bodů:

- Charakterizace a porovnání tří stacionárních fází – silikagelové, silikagelové s vázaným nativním cyklofruktanem a silikagelové s vázaným isopropyl cyklofruktanem pro hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii. Určení molekulárních interakcí zodpovědných za retenci a selektivitu v daném separačním systému a aplikace pro separaci směsi penta- a nonapeptidů.
- Prokázání odlišnosti dvou principiálně stejných amidových stacionárních fází od různých výrobců v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii z hlediska retenčního mechanismu použitím řady různých chromatografických testů.
- Vývoj analytické metody využívající hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii v kombinaci s tandemovou hmotnostní detekcí ke stanovení vybraných pterinů v kutikule ploštic různých forem *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum*.

3 STANOVENÍ ESTROGENNÍCH POLUTANTŮ METODOU KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE

3.1 Teoretický úvod

3.1.1 Estrogenní látky v životním prostředí

V posledních několika desetiletích dochází ke kontinuálnímu zvyšování znečištění životního prostředí polutanty, které kontaminují důležité přírodní zdroje a mají potenciálně škodlivý vliv na živé organismy [2, 5]. Velmi podstatnou a nebezpečnou skupinou těchto látek, vyskytujících se v životním prostředí, jsou endokrinní disruptory (ED) [6-8]. Jedná se o látky, které jsou schopny napodobovat činnost endogenních hormonů nebo s ní interferovat, mohou narušovat biosyntézu nebo metabolismus steroidů nebo pozměňovat jejich receptorová místa [6]. Mezi ED se počítá řada látek. Důležitými představiteli ED jsou estrogeny, jako 17α -estradiol (α E2), 17β -estradiol (β E2), estriol (E3), estron (E1) a syntetická kontraceptiva mestranol (M) a 17α -ethynylestradiol (EE2). Skupina ED zahrnuje také látky nesteroidní povahy, jako je 4-nonylfenol, bisfenol, diethylstilbestrol, řadu pesticidů a jiných látek [9].

Estrogeny jsou ženské pohlavní hormony, které zastávají řadu rozmanitých funkcí. Mezi hlavní funkce patří zodpovědnost za vývoj ženských sekundárních pohlavních znaků, regulace reprodukčního cyklu a růst tkání. Nepřirozený výskyt estrogenních látek v životním prostředí negativně ovlivňuje organismy. Byly zaznamenány případy klesající plodnosti, feminizace a hermafroditismu samečků vodních živočichů. Tyto jevy se vyskytovaly převážně v prostředí odpadních vod a jejich intenzita byla závislá na koncentraci přítomných estrogenů [7, 10-12]. Existuje podezření, že estrogenní látky se mohou podílet na vzniku rakoviny prsu, vaječníků a prostaty [13]. U mužů mohou mít také podíl na snížení pohyblivosti a kvality spermií [14].

Hlavním zdrojem estrogenních látek v životním prostředí je lidská populace a v menší míře také hospodářská zvířata. Vyloučené množství estrogenních látek lidským organismem závisí na mnoha faktorech, jako je věk, pohlaví, zdravotní stav, používání

různých léčiv zejména kontraceptiv aj. Estrogeny jsou v organismu biotransformovány jaterními enzymy za vzniku glukosiduronátových a sulfátových konjugátů, které již nevykazují estrogenní aktivitu [15, 16]. Tyto konjugáty jsou z organismu vylučovány převážně močí a v menší míře i výkaly. V této formě jsou estrogeny odváděny do čistíren odpadních vod (ČOV). Již při transportu do ČOV, a následně i v ČOV, dochází k hydrolýze konjugátů a uvolnění samotných hormonů v aktivní formě. ČOV využívají různé technologické postupy sloužící k zachycení a následnému odstranění polutantů z odpadních vod. Tyto postupy však nejsou pro estrogenní látky dostatečně účinné, a proto mohou být estrogenní látky nalezeny v říčních a jezerních vodách [5-7, 9, 17]. Existuje celá řada zahraničních studií zabývajících se výskytem estrogenních polutantů ve vodách [2, 11, 18-20]. V České republice se tomuto tématu také věnuje několik vědeckých skupin [21-27].

Jelikož se estrogenní látky vyskytují ve vodných vzorcích životního prostředí ve velmi nízkých koncentracích (desetiny až stovky ng/l) je pro jejich detekci, popřípadě stanovení nutné používat vysoce citlivé a selektivní analytické metody. Během posledních několika let vyšla řada odborných publikací, které přehledným způsobem podávají ucelenou informaci ohledně analytických přístupů zaměřených na stanovení estrogenních látek v životním prostředí [2, 10, 19, 28-30].

Nedílnou součástí analytických metod vhodných ke stanovení estrogenních látek v životním prostředí je předúprava vzorku. Předúprava vzorku hraje zásadní roli v celkové citlivosti analytické metody, odstranění interferujících látek a potlačení matričních efektů. Vzhledem k tomu, že vzorky určené pro analýzu obsahují obvykle velké množství organického materiálu a suspendovaných částic, je prvním krokem přípravy vzorku pro analýzu filtrace [27]. Běžně se používají filtry jako je skelná vata, celulosa a nylon o velikosti pórů mezi 0,22 a 1,20 μm [29, 31]. Poté následuje určitý typ extrakce. V analýze estrogenních polutantů se nejvíce uplatnila extrakce tuhou fází, vzhledem ke své experimentální jednoduchosti, možnosti automatizace, nízké spotřebě nevodných rozpouštědel a v neposlední řadě komerční dostupnosti sorbentů s různou selektivitou. Při extrakci tuhou fází se musí, kromě volby typu SPE sorbentu, optimalizovat řada kroků, mezi které patří kondicionace kolonky, složení a objem elučního činidla a množství nanášeného vzorku. Při analýze estrogenů v životním prostředí byl nejčastěji používaným sorbentem silikagel s navázaným okta-decylovým

řetězcem, styrendivinylnbenzen (SDB) a hydrofilně-lipofilní sorbent s komerčním názvem Oasis HLB sorbent (hydrophilic-lipophilic balanced) [27, 29, 32-34]. U zmiňovaných sorbentů byla výtěžnost extrakce vysoká (65 – 98 %) s dobrou opakovatelností. Jako velmi selektivní sorbenty byly také použity molekulárně vtištěné polymery (MIP) [29]. MIP jsou vysoce zesíťované syntetické polymery, které jsou charakterizovány specifickým rozpoznáním daného analytu. Objem nanášeného vzorku se pohyboval od několika mililitrů až po 4 litry v závislosti na typu matrice, která může ovlivňovat výtěžnost a selektivitu extrakce [27, 35]. Jako eluční činidla byla použita methanol, acetonitril, aceton a ethylacetát, popřípadě jejich kombinace (v závislosti na dané aplikaci) [31-34].

Nejpoužívanější metodou ke stanovení estrogeních polutantů je kapalinová chromatografie (LC), a to převážně ve spojení s hmotnostním detektorem nebo méně často s fluorescenčním detektorem (FD). Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem (LC-MS) nebo s tandemovým hmotnostním detektorem (LC-MS/MS) poskytuje dostatečnou citlivost a selektivitu. Nevýhodou jsou matriční efekty, které mohou způsobit potlačení nebo naopak podporu signálu sledovaných látek v ionizačním zdroji [30]. Jako stacionární fáze se uplatnily hlavně oktadecylové (C18), fenylové, fenyl-hexylové stacionární fáze v kombinaci s mobilní fází skládající se z acetonitrilu nebo methanolu a roztoků kyseliny octové, mravenčí nebo amoniaku v různých objemových poměrech. Limity detekce (LOD) se pohybovaly v závislosti na extrakčním kroku mezi 0,1 a 100 ng/l [2, 15, 16, 23, 25, 26, 27, 34-37].

Druhou nejpoužívanější metodou pro stanovení estrogeních polutantů je plynová chromatografie (GC) ve spojení s MS nebo MS/MS. I když plynová chromatografie vyniká značnou separační účinností, nízkými provozními náklady a minimální spotřebou organických rozpouštědel (pouze na vzorek), zařadila se v používání až za kapalinovou chromatografii, a to z důvodu nutnosti derivatizace estrogeních látek pro zvýšení jejich těkavosti. LOD pro estrogení polutanty se pohybovaly v závislosti na extrakčním kroku mezi 0,5 až 100 ng/l [27, 32, 33, 38-41].

Dalším způsobem, jak stanovit estrogení látky, jsou imunochemické metody. Používá se hlavně ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a RIA (radioimmunoassay). Tyto metody se vyznačují vysokou citlivostí, jednoduchou použitelností, relativně krátkou dobou potřebnou k analýze a v neposlední řadě i

cenovou dostupností. Vzhledem k vysokým interferencím z matrice a nižší estrogení specifitě se však používají spíše ke screeningovým testům [29, 42].

3.1.2 Kapilární kapalinová chromatografie

Kapilární kapalinová chromatografie je kapalinová chromatografie využívající separační kolony o malých průměrech. cLC používá kolony o vnitřním průměru 0,15 až 0,5 mm a operuje s průtoky desítek mikrolitrů eluentu za minutu. Pro ilustraci je v tabulce 3.1 uveden přehled nomenklatury kapalinových chromatografických metod uspořádaných podle zmenšujícího se vnitřního průměru kolon [43].

Tabulka 3.1 Nomenklatura kapalinových chromatografických metod uspořádaných podle zmenšujícího se vnitřního průměru kolon [43]

Název kapalinové chromatografické metody	Vnitřní průměr kolony
vysokoúčinná kapalinová chromatografie	2,0 – 4,6 mm
mikrokapalinová chromatografie	0,5 – 1,5 mm
kapilární kapalinová chromatografie	0,1 – 0,5 mm
nanokapalinová chromatografie	0,01 – 0,1 mm

Počátky mikrokapalinové chromatografie jsou datovány ke konci 60. let minulého století, kdy Horváthova skupina použila pro separaci ribonukleotidů naplněnou ocelovou kapiláru o vnitřním průměru 1 mm [44]. Následně se stala kapilární kapalinová chromatografie experimentální náplní mnoha významných vědeckých skupin, jako např. Scotta [45], Ishiiho [46-48], Novotného [49, 50] a jiných. Na základě těchto prací byla zahájena miniaturizace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

Miniaturizace v kapalinové chromatografii přináší řadu výhod, ale i některé nevýhody. Mezi výhody se řadí především nižší spotřeba stacionární a mobilní fáze, což umožňuje použití velmi drahých sorbentů a aditiv mobilní fáze. Nízké průtoky mobilní fáze jsou ve shodě s trendem “zelené chemie“, který se snaží eliminovat množství organických odpadů, a tím snížit zatížení životního prostředí. Nižší průtok mobilní fáze

kolonou vede k menšímu naředění analytů eluentem během jejich transportu kolonou k detektoru, což může vést k vyšší citlivosti u některých detektorů. Díky nízké průtokové rychlosti mobilní fáze je cLC vhodná pro spojení s hmotnostním detektorem používajícím sprejovací iontové zdroje. Nevýhody cLC jsou především na straně instrumentace. Menší množství dávkovaného vzorku a nižší průtoky eluentu kladou velké nároky na minimalizaci mimokolonových příspěvků (mrtvých objemů) kapilárního kapalinového systému, chceme-li dokonale využít vyšší separační účinnost, jež kapilární kolony nabízejí. Nejčastějším technickým problémem cLC může být příprava účinné kapilární separační kolony. Přípravě kolon vhodných pro cLC se věnuje řada publikací [3, 51-54]. V současné době je komerčně dostupné velké množství kapilárních kolon se širokou nabídkou různých sorbentů.

I přes své problémy, je cLC hojně využívána v řešení řady analytických problémů. V posledních několika letech nabývá na významu spojení cLC s hmotnostně spektrometrickou detekcí, kde se využívá vysoká separační účinnost společně s citlivou a selektivní detekcí [23, 55, 56].

3.1.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie – trojitý kvadrupól

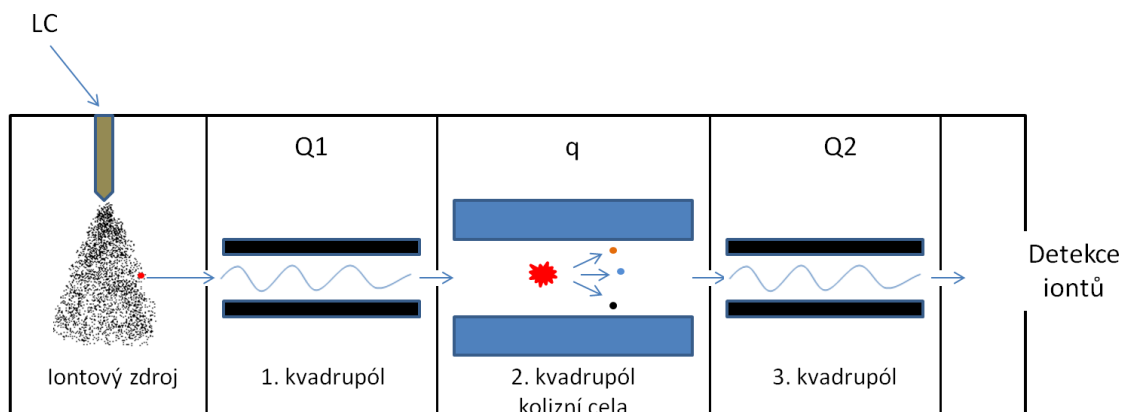
Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, jejíž princip je založen na separaci iontů v elektromagnetickém poli podle jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Posledních 20 let bylo ve znamení velkého instrumentálního pokroku v oblasti hmotnostní spektrometrie. Spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií se díky sprejovacím ionizačním technikám stalo běžně používanou metodou téměř ve všech analytických laboratořích s různou oblastí zájmu, např. v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, toxikologii, ekologii a v mnoha dalších odvětvích [57-59].

V současné době je komerční trh s MS detektory a LC-MS velmi dynamický a jednotliví výrobci hmotnostních spektrometrů investují velké finanční prostředky do vývoje nových technologií. Tento přístup má kladný efekt na četnost nových produktů a různých technických řešení [1, 57, 58]. Klíčovým prvkem každého MS detektoru je hmotnostní analyzátor. Běžný uživatel může vybírat z řady komerčně dostupných MS

detektorů podle jejich vhodnosti pro danou aplikaci. Mezi základní MS detektory se řadí MS detektor s kvadrupólovým analyzátelem (Q), s iontovou pastí (IT) a s průletovým analyzátelem (TOF). Dále existují MS detektory s magnetickým sektorovým analyzátelem, 3D a lineární iontovou pastí (LIT), orbitrapem a iontovou cyklotronovou rezonancí (ICR). Jednotlivé hmotnostní analyzátory se liší různou rozlišovací schopností, správností určení m/z , hmotnostním rozsahem, dynamickým koncentračním rozsahem a rychlostí záznamu spekter. Parametry jednotlivých komerčních MS detektorů jsou shrnuty v přehledném článku Holčapka [1].

Výhody jednotlivých hmotnostních analyzátorů jsou s úspěchem využity v hybridních hmotnostních spektrometrech, kde jsou zapojeny dva hmotnostní analyzátory do série a navzájem jsou odděleny kolizní celou. To umožňuje provádět fragmentaci jednotlivých iontů a tím získat cenné strukturní informace. Na trhu jsou k dostání tyto hybridní hmotnostní spektrometry: trojitý kvadrupól (QqQ), kvadrupól-iontová past (Q-IT), kvadrupól-průletový analyzátor (Q-TOF), kvadrupól-orbitrap, kvadrupól-iontová cyklotronová rezonance (Q-ICR), kvadrupól-iontová mobilita-průletový analyzátor (Q-IMS-TOF), iontová past-průletový analyzátor (IT-TOF), lineární iontová past-orbitrap a lineární iontová past-iontová cyklotronová rezonance (LIT-ICR) [1, 57, 58, 60].

Jedny z nejpoužívanějších hybridních hmotnostních spektrometrů jsou trojité kvadrupóly. QqQ byl vyvinut již v roce 1978 na Michiganské státní univerzitě Yostem a Enkem [60]. QqQ se skládá ze dvou kvadrupólů (Q1 a Q2), mezi kterými je umístěna kolizní cela (q). Q1 a Q2 slouží jako filtry, které díky vhodně zvolenému napětí propouští pouze ionty o definovaném poměru m/z . Kolizní cela je řešena nejčastěji jako oktapól nebo hexapól a je naplněna kolizním plynem (N_2 , He, Ar nebo Xe). Kolizní plyn slouží k fragmentaci prekurzorového iontu, tj. k tzv. kolizně indukované disociaci. QqQ obecně dosahuje vysoké citlivosti, má široký dynamický koncentrační rozsah (běžně okolo pěti řádů) a vysokou skenovací rychlost, což činí QqQ vhodným nástrojem ke kvantitativním analýzám. Mezi nevýhody QqQ se počítá nižší rozlišovací schopnost, nižší správnost určení poměru m/z a nižší hmotnostní rozsah [57]. Schéma QqQ je uvedeno na obrázku 3.1.



Obrázek 3.1 Schéma trojitého kvadrupólu.

QqQ je schopen pracovat v několika módech. Každý z módů pracuje na trochu jiném principu a je schopen podat různé informace. Základním typem je MS sken, který pracuje v režimu jednoduchého kvadrupólu, kdy na Q2 dochází k filtraci iontů, Q1 a q slouží jako iontová optika. Pomocí tohoto módu získáme celkové hmotnostní spektrum dané látky. Druhým typem módu je monitorování vybraného iontu (SIM – selected ion monitoring). Zde je aktivní Q1, který je nastaven na požadovanou hodnotu m/z , ostatní kvadrupóly slouží opět jako iontová optika. Tímto módem získáme záznam intenzity dané m/z ve vzorku. Třetím typem módu je sken produktových iontů. Tento mód pracuje tak, že Q1 projde definovaná m/z , ta je fragmentována v kolizní cele, vzniklé fragmenty jsou skenovány Q2 a následně dopadají na detektor. Tímto postupem získáme hmotnostní spektrum fragmentů vzniklých štěpením definované m/z . Dalším módem je multiple reaction monitoring mód (MRM), kdy pracuje systém v režimu trojitého kvadrupólu. Prvním kvadrupólem projde definovaná m/z (prekurzorový iont), ta je rozštěpena v kolizní cele, třetím kvadrupólem projde definovaná m/z (produktový iont) a ta je detekována. Tímto skenem získáme vysokou selektivitu, založenou na přechodu mezi prekurzorovým a produktovým iontem sledované látky. Dalším módem je sken prekurzorových iontů. V tomto módu je Q2 nastaven na fixní hodnotu m/z , Q1 propouští ionty v určitém rozsahu m/z , které jsou fragmentovány v kolizní cele. Tímto módem zjistíme, z jakého iontu vzniká námi zvolený produktový iont. Posledním běžným módem používaným u QqQ je sken neutrálních ztrát. Při tomto módu Q1

propouští ionty v určitém rozsahu m/z , které jsou fragmentovány v kolizní cele a Q2 skenuje hmotnostní spektrum vzniklých fragmentů a zaznamenává neutrální posun (např. ztráta vody).

3.1.4 Povrchově porézní částice

V souvislosti se zvyšujícími se nároky na počet analýz za časovou jednotku dochází k neustálému vývoji analytických technik. Tento trend je patrný i v kapalinové chromatografii. V praxi se aplikují celkem dva přístupy jak dosáhnout „rychlé chromatografie“. Prvním z nich je použití separačních kolon s částicemi menšími než 2 μm . Díky těmto kolonám se dosahuje vysoké účinnosti separací, ale zároveň dochází k razantnímu navýšení tlaku v systému (až 100 MPa). Použití těchto kolon vyžaduje speciální instrumentaci, která je schopna těmto tlakům odolat. Pro kapalinovou chromatografii s těmito kolonami se používá označení ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) [61, 62]. Druhým přístupem „rychlé chromatografie“ je použití kolon monolitických nebo kolon s povrchově porézními částicemi. U těchto kolon se může používat klasická HPLC instrumentace, neboť tlak v systému většinou nepřesahuje 40 MPa [62, 63].

Povrchově porézní částice, v angličtině označovány jako „fused-core silica“ nebo „core-shell particles“, byly představeny Kirklandem a následně komercializovány pod názvem HALO částice [65]. Tyto částice jsou tvořeny neporézním silikovým jádrem o velikosti 1,7 μm , které bylo obaleno 0,5 μm silnou vrstvou slinutých silikových nanočástic. Konečná velikost částice stacionární fáze byla tedy 2,7 μm [65]. Stejně rozměry, nebo velmi podobné lze najít i u dalších kolon, např. Ascentis (Sigma-Aldrich), Poroshell (Agilent) nebo Kinetex (Phenomenex). V současné době jsou na trhu k dostání také kolony s povrchově porézními částicemi o velikosti 5 μm (Ascentis a Kinetex), 1,7 μm (Kinetex), 1,6 μm (Cortecs od firmy Waters) a 1,3 μm (Kinetex). U zmiňovaných kolon lze vybírat z řady různých typů navázaných skupin (C18, C8, C3, fenyl-hexyl, PFP, amid aj.).

Výhodou povrchově porézních částic je možnost dosáhnout srovnatelné účinnosti separace na klasickém HPLC instrumentu jako při použití UHPLC s částicemi menšími než 2 μm . Na rozdíl od porézních částic stejného průměru je difúze analytů u povrchově

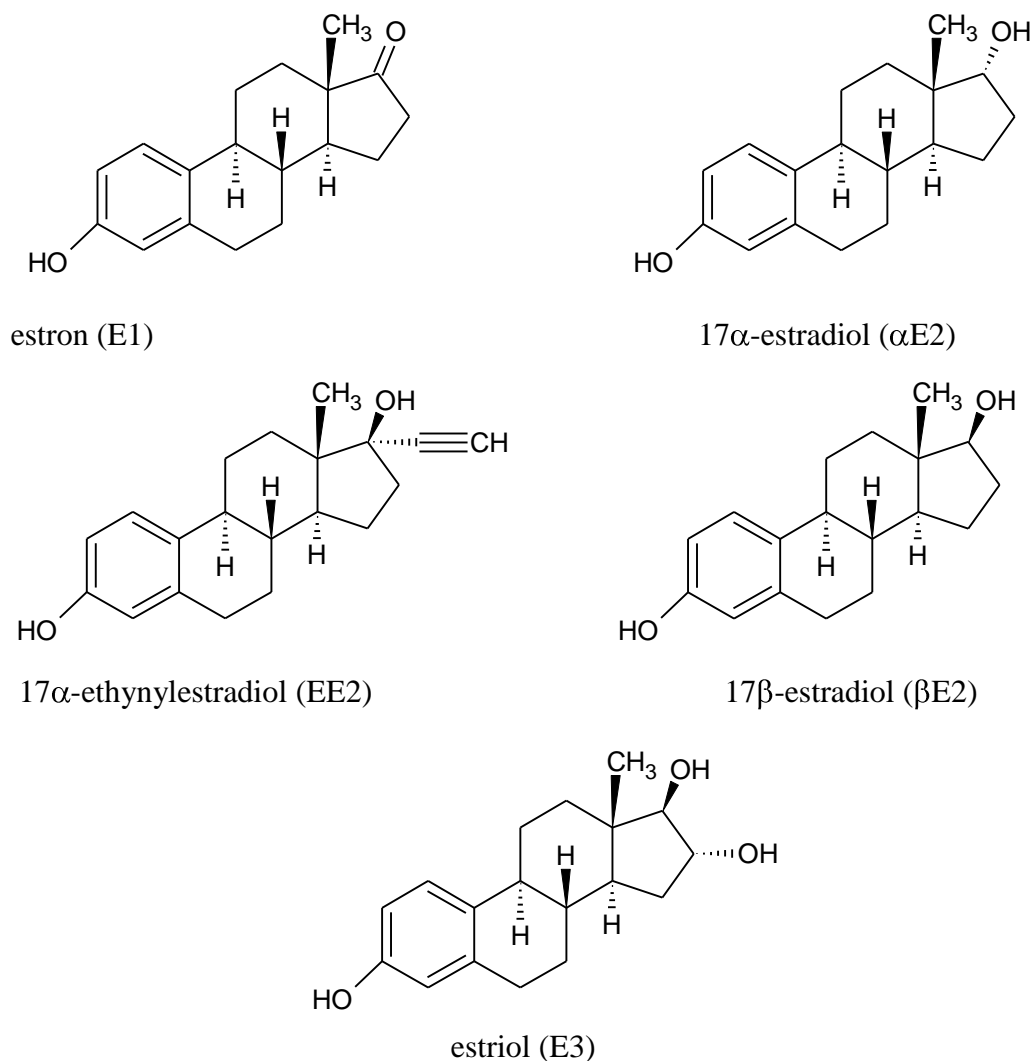
porézních částic mnohem menší. To znamená, že rozmývání chromatografických zón je omezené [63]. Kolony naplněné povrchově porézními částicemi mají užší distribuci velikosti částic a vyšší hustotu naplnění kolony v porovnání s klasickými plně porézními částicemi. To vše se podílí na vysoké separační účinnosti kolon s povrchově porézními částicemi [62, 64, 66, 67].

V rámci studia chromatografického chování sledovaných estrogeních látek (viz obr. 3.2) byly porovnány klasická HPLC separační kolona SunFire (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m; Waters, MA, USA) a kapilární kolona Zorbax SB C18 (150 mm x 0,5 mm, 5 μ m; Agilent Technologies, Waldbroon, Německo) s povrchově porézní kolonou Ascentis Express C8 fused core (150 mm x 4,6 mm, 2,7 μ m; Supelco, Bellefonte, USA). Výsledky byly shrnuty a publikovány na konferenci 7th ISC Modern Analytical Chemistry (Praha, 2011). Rozšířený abstrakt shrnující výsledky srovnání výše zmíněných kolon z této konference je uveden v příloze I.

3.2 Výsledky a diskuse – komentář k publikaci

3.2.1 Vývoj metody kapilární kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí ke stanovení estrogenních látek ve vodách – Publikace I

Všechna měření byla prováděna na kapilárním kapalinovém chromatografu Agilent 1200 spojeném s hmotnostním tandemovým trojitým kvadrupólem 6460 (Agilent Technologies, Waldbroon, Německo). Struktura estrogenních polutantů studovaných v této práci je znázorněna na obrázku 3.2.



Obrázek 3.2 Struktura studovaných estrogenů.

Měření byla prováděna v MRM módu. Na základě polaritý studovaných estrogenů byl pro separaci zvolen reverzní chromatografický mód. Separace probíhala na komerčně dostupné kapilární koloně Zorbax SB C18 (150 mm x 0,5 mm, 5 µm; Agilent Technologies, Waldbrook, Německo). Při použití izokratické eluce došlo k separaci všech studovaných estrogených polutantů, ale současně bylo pozorováno potlačení ionizace estriolu matričními efekty. Proto byla testována gradientová eluce. V tabulce 3.2 je uveden optimalizovaný gradientový profil při průtoku mobilní fáze 18 µl/min, při kterém nedošlo k ovlivnění ionizace žádného studovaného analytu a současně došlo k dostatečné separaci všech studovaných analytů.

Tabulka 3.2 Gradientový profil optimálního složení mobilní fáze. A je acetonitril s 0,1% kys. mravenčí, B je 0,1% roztok kys. mravenčí

Čas (min)	A (%)	B (%)
0	26	74
3	38	62
5	38	62
8	42	58
16	42	58
17	26	74
18	26	74

Při daném složení mobilní fáze poskytovaly studované estrogeny vyšší odezvu v pozitivním módu elektrospreje oproti negativnímu módu, který byl v řadě publikací široce využíván [28]. Proto bylo následně pracováno pouze v pozitivním módu. Hmotnostní spektra z MS skenu a skenu produktového iontu v pozitivním módu jsou pro všechny studované analyty uvedena v příloze II. Předpokládané struktury prekurzorových a produktových iontů jsou převzaty z publikace Bourciera a kol. [68].

SPE studovaných estrogenů byla testována na třech komerčně dostupných extrakčních kolonkách: Sep-Pak C18 (Waters Corporation, Milford, USA), Discovery DSC-18 s polymerně vázaným oktadecylem na silikagelu (Supelco, Bellefonte, USA) a Discovery DSC-18Lt s monomerně vázaným oktadecylem na silikagelu (Supelco, Bellefonte, USA). Nejlepších výsledků z hlediska výtěžnosti a opakovatelnosti extrakce bylo dosaženo na kolonce Discovery DSC-18Lt. Výtěžnost a opakovatelnost extrakce byla testována pro všechny studované analyty na třech koncentračních hladinách, a to 25, 50 a 250 ng/l pro deionizovanou vodu a pro říční vodu odebranou z řeky Úhlavy

v blízkosti města Klatovy, která neobsahovala studované analyty. Výtěžnost extrakce se pohybovala v rozmezí 95 – 100 % s relativní směrodatnou odchylkou nižší než 7,2 %. Statisticky významný rozdíl mezi destilovanou a říční vodou nebyl zaznamenán.

Kvantifikace reálných vzorků byla prováděna na základě kalibrační přímky získané za optimalizovaných separačních, detekčních a extrakčních podmínek. Jako médium byla použita říční voda (Úhlava, Klatovy), u které nebyla zjištěna přítomnost sledovaných polutantů. Limity detekce se pohybovaly v rozmezí 5 – 7 ng/l a limity kvantifikace v rozmezí 10 – 25 ng/l.

Nově vyvinutá cLC-MS/MS metoda s SPE byla použita k analýze 6 vzorků vod odebraných v období září až prosinec 2009. Odběrovými místy byly Vltava (Praha - cca 900 metrů nad centrální čistírnou odpadních vod na Císařském ostrově), Botičský potok (Praha), vstup do čistírny odpadních vod na Císařském ostrově (Praha), výstup z čistírny odpadních vod na Císařském ostrově (Praha), Úhlava (Klatovy) a Úhlava (Plzeň). Výsledky nalezených estrogenních látek a jejich koncentrace jsou uvedeny v tabulce 3.3.

Tabulka 3.3 Výsledky nalezených koncentrací estrogenů ve vzorcích vod z různých lokalit (odebraných v období září až prosinec 2009) a analyzovaných optimalizovanou metodou cLC-MS/MS po SPE. V závorce jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky ($n = 9$)

Lokalita	Koncentrace E3 (ng/l)	Koncentrace β E2 (ng/l)	Koncentrace α E2 (ng/l)	Koncentrace EE2 (ng/l)	Koncentrace E1 (ng/l)
Botič (Praha)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Vltava (Praha)	< LOD	13,2 (5,5)	< LOD	< LOD	< LOD
Vstup ČOV Císařský ostrov (Praha)	188,6 (6,8)	21,4 (7,2)	< LOD	100,7 (4,4)	20,5 (8,4)
Výstup ČOV Císařský ostrov (Praha)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Úhlava (Klatovy)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Úhlava (Plzeň)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Z tabulky 3.3 je patrné, že estrogení polutanty byly nalezeny pouze ve dvou vzorcích. A to na odběrovém místě Vltava (Praha - cca 900 metrů nad centrální čistírnou odpadních vod na Císařském ostrově) a na vstupu do čistírny odpadních vod na Císařském ostrově (Praha), což může souviset s vysokou zatížeností Prahy. V ostatních vzorcích nebyly nalezeny žádné estrogení látky. Skutečnost, že nebyly nalezeny žádné estrogeny na výstupu z čistírny odpadních vod na Císařském ostrově (Praha) ukazuje na účinný čistící proces této čistírny odpadních vod, který je schopen velmi dobře odstranit estrogení látky z odpadních vod.

3.3 Literatura I

- [1] Holcapek, M., Jirasko, R., Lisa, M.: J. Chromatogr. A 1259 (2012) 3-15.
- [2] Petrovic, M., Hernando, M. D., Diaz-Cruz, M. S., Barcelo, D.: J. Chromatogr. A 1067 (2005) 1-14.
- [3] Svec, F.: J. Sep. Sci. 27 (2004) 1419-1430.
- [4] Hemstrom, P., Irgum, K.: J. Sep. Sci. 29 (2006) 1784-1821.
- [5] Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., Matsuura, T.: Desalination 239 (2009) 229-246.
- [6] Crisp, T. M., Clegg, E. D., Cooper, R. L., Wood, W. P., Anderson, D. G., Baetcke, K. P., Hoffmann, J. L., Morrow, M. S., Rodier, D. J., Schaeffer, J. E., Touart, L. W., Zeeman, M. G., Patel, Y. M.: Environ. Health Perspect. 106 (1998) 11-56.
- [7] Colborn, T., Saal, F. S. V., Soto, A. M.: Environ. Health Perspect. 101 (1993) 378-384.
- [8] Eertmans, F., Dhooge, W., Stuyvaert, S., Comhaire, F.: Toxicol. in Vitro 17 (2003) 515-524.
- [9] Basile, T., Petrella, A., Petrella, M., Boghetich, G., Petruzzelli, V., Colasuonno, S., Petruzzelli, D.: Ind. Eng. Chem. Res. 50 (2011) 8389-8401.
- [10] Giese, R. W.: J. Chromatogr. A 1000 (2003) 401-412.
- [11] Martinovic-Weigelt, D., Minarik, T. A., Curran, E. M., Marchuk, J. S., Pazderka, M. J., Smith, E. A., Goldenstein, R. L., Miresse, C. L., Matlon, T. J., Schultz, M. M., Schoenfuss, H. L.: Environment. International 61 (2013) 127-137.
- [12] Mills, L. J., Chichester, C.: Sci. Total Environ. 343 (2005) 1-34.
- [13] Russo, J., Lareef, M. H., Tahin, Q., Hu, Y. F., Slater, C., Ao, X., Russo, I. H.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 80 (2002) 149-162.
- [14] Vidaeff, A. C., Sever, L. E.: Reprod. Toxicol. 20 (2005) 5-20.
- [15] Beck, I. C., Bruhn, R., Gandrass, J., Ruck, W.: J. Chromatogr. A 1090 (2005) 98-106.
- [16] Gross-Sorokin, M. Y., Roast, S. D., Brighty, G. C.: Environ. Health Perspect. 114 (2006) 147-151.

- [17] Campbell, C. G., Borglin, S. E., Green, F. B., Grayson, A., Wozel, E., Stringfellow, W. T.: *Chemosphere* 65 (2006) 1265-1280.
- [18] Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Reis, M., Rocha, E., Pardal, M.: *Environ. Monit. Assess.* 185 (2013) 8215-8226.
- [19] Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M. J. L., Barcelo, D.: *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 97-115.
- [20] Gabet-Giraud, V., Miege, C., Choubert, J. M., Ruel, S. M., Coquery, M.: *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 4257-4269.
- [21] Morteani, G., Moller, P., Fuganti, A., Paces, T.: *Environ. Geochem. Health* 28 (2006) 257-264.
- [22] Grabic, R., Jurcikova, J., Tomsejova, S., Ocelka, T., Halirova, J., Hypr, D., Kodes, V.: *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 550-555.
- [23] Kozlik, P., Bosakova, Z., Tesarova, E., Coufal, P., Cabala, R.: *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2127-2132.
- [24] Jarosova, B., Blaha, L., Vrana, B., Randak, T., Grabic, R., Giesy, J. P., Hilscherova, K.: *Environment International* 45 (2012) 22-31.
- [25] Hajkova, K., Pulkrabova, J., Schurek, J., Hajslova, J., Poustka, J., Napravnikova, M., Kocourek, V.: *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1351-1363.
- [26] Matejicek, D., Houserova, P., Kuban, V.: *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 80-89.
- [27] Kozlik, P.: *Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze* 2010.
- [28] de Alda, M. J. L., Barcelo, D.: *Fresen. J. Anal. Chem.* 371 (2001) 437-447.
- [29] Pacakova, V., Loukotkova, L., Bosakova, Z., Stulik, K.: *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 867-882.
- [30] Tomsikova, H., Aufartova, J., Solich, P., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodriguez, J. J., Novakova, L.: *Trends Anal. Chem.* 34 (2012) 35-58.
- [31] Huang, C. H., Sedlak, D. L.: *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 133-139.
- [32] Fernandez, M. P., Ikonomidou, M. G., Buchanan, I.: *Sci. Total Environ.* 373 (2007) 250-269.
- [33] Gomes, R. L., Avcioglu, E., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N.: *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 737-744.
- [34] Higashi, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 54 (2006) 1479-1485.

- [35] Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A., Suzuki, H., Morita, M.: J. Chromatogr. A 984 (2003) 195-202.
- [36] Farre, M., Kuster, M., Brix, R., Rubio, F., de Alda, M. J. L., Barcelo, D.: J. Chromatogr. A 1160 (2007) 166-175.
- [37] Schlusener, M. P., Bester, K.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 3269-3278.
- [38] Mol, H. G. J., Sunarto, S., Steijger, O. M.: J. Chromatogr. A 879 (2000) 97-112.
- [39] Quintana, J. B., Carpinteiro, J., Rodriguez, I., Lorenzo, R. A., Carro, A. M., Cela, R.: J. Chromatogr. A 1024 (2004) 177-185.
- [40] Stanford, B. D., Weinberg, H. S.: J. Chromatogr. A 1176 (2007) 26-36.
- [41] Peng, X. Z., Wang, Z. D., Yang, C., Chen, F. R., Mai, B. X.: J. Chromatogr. A 1116 (2006) 51-56.
- [42] Munro, C. J., Laughlin, L. S., VonSchalscha, T., Baldwin, D. M., Lasley, B. L.: Contraception 54 (1996) 43-53.
- [43] Vissers, J. P. C., Claessens, H. A., Cramers, C. A.: J. Chromatogr. A 779 (1997) 1-28.
- [44] Horvath, C. G., Preiss, B. A., Lipsky, S. R.: Anal. Chem. 39 (1967) 1422-1428.
- [45] Scott, R. P. W., Kucera, P.: J. Chromatogr. 125 (1976) 251-263.
- [46] Ishii, D., Asai, K., Hibi, K., Jonokuchi, T., Nagaya, M.: J. Chromatogr. 144 (1977) 157-168.
- [47] Ishii, D., Hibi, K., Asai, K., Jonokuchi, T.: J. Chromatogr. 151 (1978) 147-154.
- [48] Ishii, D., Hibi, K., Asai, K., Nagaya, M.: J. Chromatogr. 152 (1978) 341-348.
- [49] Tsuda, T., Novotny, M.: Anal. Chem. 50 (1978) 632-634.
- [50] Tsuda, T., Novotny, M.: Anal. Chem. 50 (1978) 271-275.
- [51] Borra, C., Han, S. M., Novotny, M.: J. Chromatogr. 385 (1987) 75-85.
- [52] Franc, M., Vojta, J., Sobotnikova, J., Coufal, P., Bosakova, Z.: Chem. Pap. 68 (2014) 22-28.
- [53] Stulik, K., Pacakova, V., Suchankova, J., Coufal, P.: J. Chromatogr. B 841 (2006) 79-87.
- [54] Svobodova, A., Krizek, T., Sirc, J., Salek, P., Tesarova, E., Coufal, P., Stulik, K.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1544-1547.

- [55] Barroso, A., Gimenez, E., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V.: *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 167-175.
- [56] Fanali, C., Dugo, L., Dugo, P., Mondello, L.: *Trends Anal. Chem.* 52 (2013) 226-238.
- [57] Himmelsbach, M.: *J. Chromatogr. B* 883 (2012) 3-17.
- [58] Liang, Y., Wang, G. J., Xie, L., Sheng, L. S.: *Curr. Drug Metab.* 12 (2011) 329-344.
- [59] Niessen, W. M. A.: *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 407-435.
- [60] Dooley, K. C.: *Clin. Biochem.* 36 (2003) 471-481.
- [61] Yost, R. A., Enke, C. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 2274-2275.
- [62] DeStefano, J. J., Langlois, T. J., Kirkland, J. J.: *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 254-260.
- [63] Svec, F.: *Chem. Listy* 103 (2009) 266-270.
- [64] Salisbury, J. J.: *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 883-886.
- [65] Kirkland, J. J.: *Anal. Chem.* 64 (1992) 1239-1245.
- [66] Cavazzini, A., Gritti, F., Kaczmariski, K., Marchetti, N., Guiochon, G.: *Anal. Chem.* 79 (2007) 5972-5979.
- [67] Gritti, F., Cavazzini, A., Marchetti, N., Guiochon, G.: *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 289-303.
- [68] Bourcier, S., Poisson, C., Souissi, Y., Kinani, S., Bouchonnet, S., Sablier, M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2999-3010.

PUBLIKACE I

DEVELOPMENT OF A SOLID-PHASE EXTRACTION WITH CAPILLARY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR ANALYSIS OF ESTROGENS IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES

Kozlík, P.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.; Coufal, P.; Čabala, R.

J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2127-2132.



Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples

Petr Kozlák^{a,*}, Zuzana Bosáková^{a,*}, Eva Tesařová^b, Pavel Coufal^a, Radomír Čabala^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, Czech Republic

^b Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2010

Received in revised form 3 October 2010

Accepted 6 October 2010

Available online 13 October 2010

Keywords:

Estrogen pollutants

Capillary liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Solid-phase extraction

Environmental water sample

Quantitation

ABSTRACT

Capillary liquid chromatography (cLC) hyphenated with tandem mass spectrometry (MS–MS) was used to separate and quantitate trace concentrations of five estrogens in aqueous samples. New C₁₈-based sorption materials bound to the silica support by monomeric and polymeric mechanisms were compared and tested for solid-phase extraction (SPE) of selected analytes with respect to optimization of their preconcentration yield. Application of an endcapped, monomer-bound preconcentration Discovery DSC-18Lt column under the optimized conditions provides yields in the range from 95 to 100% with a high repeatability ($n = 3$, $RSD \leq 7.2\%$). Using the electrospray ionization in the positive mode (ESI+), the cLC–MS–MS system (the Zorbax SB C18 capillary column and a binary mobile phase of acetonitrile and water containing 0.1% formic acid in both the components) was optimized to attain a sufficient retention of the early eluting estrinol, a satisfactory resolution of the analytes and the maximum sensitivity of the determination. Both the isocratic and gradient elution were used and the optimized gradient method permitted analyses of aqueous environmental samples in 14 min within a linearity range from 6.1 to 25.0 (LOQ of analytes) to 500 ng/L and with a very good linearity ($r > 0.9981$) for all the estrogens studied. The detection limits are in the range from 3.0 to 6.8 ng/L (1 μ L injection volume). Six environmental water samples were analyzed and the studied estrogens were found in the Vltava river sample collected in Prague (13.2 ng/L for 17 β -estradiol) and in the inlet to the wastewater treatment plant in Prague, at an overall concentration of 371.4 ng/L.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The greatly varied human activities cause continuously increasing environmental pollution, with the pollutant range becoming progressively more complex. A relatively ubiquitous class of pollutants are substances which affect the endocrine systems of a wide spectrum of organisms. These substances, called endocrine disruptors (EDs), may imitate the activities of endogenous hormones, or may interfere with them [1,2]. Mostly, they enter the environment as a part of human wastes and could create a risk for reproduction of organisms even if they are present at very low concentrations. Changes in the sex and in the reproduction functions for reptiles, birds, amphibians, crustacea and fish caused by the presence of estrogens in the environment have been published [3]. During recent decades, the occurrence of testicular tumors and develop-

mental defects of reproduction organs in the human population have increased and the quality of human spermiogram has substantially deteriorated [4,5]. The presence of estrogen pollutants, together with unhealthy lifestyle, may be one of the causes. Some negative effects of EDs on the human reproduction have already been demonstrated (diethylstilbestrol), or are being tested (e.g., bisphenol A, nonylphenol, etc.) [4–7].

Biogenic hormones, such as 17 β -estradiol (β E2), 17 α -estradiol (α E2), estriol (E3), estrone (E1) and the synthetic contraceptives mestranol (M) and 17 α -ethynylestradiol (EE2), belong to the group of estrogen pollutants. After their absorption in the organism, they are transformed into more polar glucuronates or sulfates and removed by excretion. They enter wastewaters as a part of excrements and are treated in a wastewater treatment plant (WWTP) where they can be degraded by microorganisms or adsorbed on solid particles. They can then be liberated again during the subsequent treatment of the sewage or when using wastes as fertilizers [8–10].

The analytical methods for estrogens have already been reviewed [11–15]. Most analyses are directed toward the determination of free estrogens in aqueous matrices, such as surface

* Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Science, Albertov 2030, 128 43, Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 221951231; fax: +420 224 913 538.

E-mail address: bosakova@natur.cuni.cz (Z. Bosáková).

water, WWTP outflow or urine [11]. However, these compounds have also been studied in solid samples, such as sediments or sewage sludge [16–19]. Recently, not only the free estrogens, but also their conjugates (glucuronates and sulfates) have been determined [20–22]. Owing to the low concentrations of estrogen pollutants (tens to hundreds of ng/L) in environmental samples, the analyses require highly sensitive methods combined with efficient pre separation and preconcentration techniques. Solid-phase extraction (SPE) using various sorbent types and elution solvents is one of the most often employed sample pretreatment methods [11,23]. However, it suffers from some principal and common drawbacks, involving poor selectivity, coextraction of interfering matrix components and lower recoveries (up to 90%). Application of immunoaffinity extraction of estrogens has also been published [11].

Immunochemical methods (ELISA), combined with gas chromatography (GC) and liquid chromatography (HPLC), are most often used for the estrogen determination. Each of these techniques has some advantages but also suffers from some drawbacks. For example, immunochemical methods permit rapid screening and a preconcentration step is sometimes unnecessary [24,25]. However, non-specific binding interactions may decrease the sensitivity of determination. Gas chromatography permits rapid and sensitive analyses, mostly in combination with mass- (GC–MS) or tandem mass spectrometric detection (GC–MS–MS), however, conversion of the analytes into more volatile derivatives, usually through silylation or acylation, is commonly required after the preconcentration step [13,26,27]. HPLC methods permit direct analyses of estrogens without preliminary derivatization and many ionization and monitoring modes are available for mass spectrometric detection. HPLC–MS and HPLC–MS–MS techniques are most common, followed by HPLC with UV photometric, fluorescence and electrochemical detection in analyses of aqueous samples of estrogen pollutants [28–32]. HPLC–MS–MS with electrospray ionization in the negative mode (ESI–) exhibits a very high detection sensitivity [12,29,32,33].

The problems of determination of estrogen pollutants in river and sewage waters have primarily been elaborated in Japan, Spain and Germany and only a few studies have been carried out about the river water pollution with estrogens in the Czech Republic, namely a GC–MS method for the estrogen analysis of the Vltava river sediments in Prague [18,19], a gas chromatography–time of flight mass spectrometric (GC–TOF–MS) method for the Vltava river water at several sites close to Prague [34] and a liquid chromatography–ion-trap mass spectrometric method for the Svratka river water at various sites [35].

The contemporary trends in analytical activities lead to efforts concerning the introduction of approaches gentle to the environment (the green chemistry), involving limited use of nonaqueous solvents and minimization of the consumption of solutions, sorbents and chemicals [36]. One way to attaining these requirements is miniaturization of the separation system, provided that sufficient sensitivity, selectivity, reliability and robustness of the determination are preserved. This is often difficult to attain. In addition to capillary electrophoresis (CE), micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and capillary electrochromatography (CEC), a promising approach seems to be the use of capillary liquid chromatography (cLC), which preserves the separation advantages of classical HPLC, saves the chemicals and attains a sufficiently high sensitivity when combined with mass spectrometric detection [37].

This work aims at development of a new miniaturized cLC method applicable to identification and quantitation of selected estrogen pollutants in the environment, at very low analyte concentrations of tenths to hundreds of ng/L. A modern capillary liquid chromatograph hyphenated with the MS–MS detection and

employing less frequent positive electrospray ionization (ESI) mode is used for this investigation. Additionally, a new type of sorbents is tested for solid-phase extraction which should permit effective preconcentration of estrogens and minimize its drawbacks mentioned above. The proposed cLC–ESI–MS–MS procedure is optimized with respect to the limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ), and the values obtained are evaluated and compared with the published ones.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

Acetonitrile and methanol (gradient grade) were supplied by Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Ethyl acetate and acetone (both of the p.a. purity) were provided by Penta (Chrudim, the Czech Republic). Formic acid (purity 98–100%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Standards of estrone (> 99%), 17 α -estradiol (99%), 17 β -estradiol (98%), 17 α -ethynylestradiol (98%) and estriol (99%) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA); for their structures, see Fig. 1. Stock solutions of the individual standards at a concentration of 0.1 mg/mL were prepared by dissolving the compounds in methanol and were stored at 5 °C. Stock solutions of a mixture of all the standards in methanol, at concentrations of 100–1000 ng/mL, were prepared weekly. Working aqueous solutions of mixtures of all the standards were prepared daily by diluting the methanolic stock solution with water, to attain the required concentrations for calibration measurements. The water used in this work was purified with a Milli-Q water purification system from Millipore (Bedford, USA).

2.2. Sampling, sample pretreatment and preconcentration

Environmental water samples were collected in the autumn 2009 at several locations (The Vltava river in Prague, Uhlava river in Klatovy and Pilsen, all in the Czech Republic) and cover both densely inhabited areas, where urban wastewaters represent a significant input to the river water (Prague), and relatively clean areas (Klatovy, Pilsen). The river water samples, collected in precleaned amber glass bottles, were filtered with Mobile phase filtration apparatus (Supelco, Bellefonte, USA) through 0.45- μ m Nylon filters (Millipore, Bedford, USA) to remove particulate and other suspended solid matter. The filtered samples were immediately preconcentrated by SPE using a Visiprep SPE Vacuum Manifold from Supelco (Bellefonte, USA). Three different types of SPE cartridges, all of 1 ml volume, packed with 100 mg of a C18 phase bonded to silica gel, were tested for their efficiency. These cartridges were a Sep-Pak Vac C18 with monomeric octadecyl-bonded silica, endcapped (Waters, Milford, USA), a polymeric Discovery DSC-18 and a monomeric Discovery DSC-18LT, both with octadecyl-bonded silica, endcapped (Supelco, Bellefonte, USA). All the SPE columns used were first activated by rinsing with 5 mL of deionized water, 5 mL of methanol and 5 mL of deionized water, all at a flow rate of 5 mL/min. After the passage of the aqueous solution at a selected flow rate, the SPE column was rinsed with 10 mL of deionized water to remove highly polar components of the aqueous matrix and was dried by passage of nitrogen. The eluate was filtered again prior to its injection into the chromatographic system, through a 0.2 μ m filter Spartan 13/0.2 RC (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA).

2.3. Instrumentation and the experimental conditions

The HPLC experiments were performed using a Series 1200 Capillary Liquid Chromatograph with a Triple Quad LC/MS 6460 tandem mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbrook,

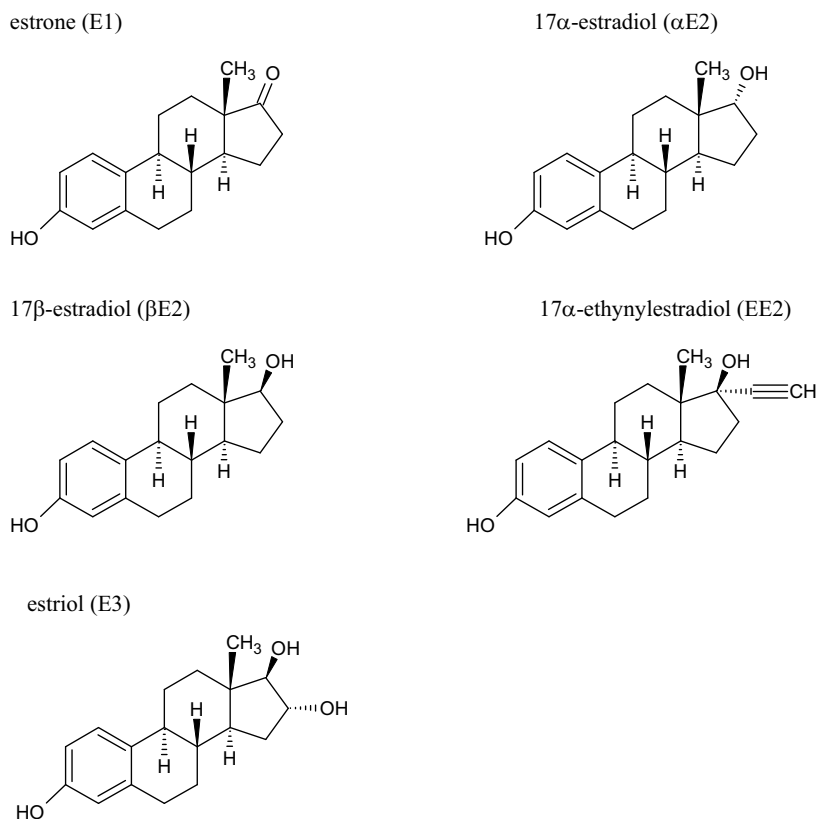


Fig. 1. Chemical structures of the estrogens studied.

Germany) and with an electrospray ionization interface, an automated injector, a column oven, a degasser and a quaternary pump. The chromatograms were recorded and evaluated by means of the MassHunter Workstation Acquisition (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany). A Zorbax SB C18 capillary column (150 mm \times 0.5 mm i.d., particle size 5 μ m, Agilent Technologies, Waldbroon, Germany) was used. A PEEK inline microfilter including 0.5 μ m frit (Supelco, Bellefonte, USA) protected the capillary column.

The chromatographic measurements employed both the isocratic and gradient elution. The mobile phases for isocratic elution were prepared by mixing acetonitrile and water (both containing 0.1% formic acid) at various volume ratios. The mobile phase flow rate was set at 18 μ L/min. The gradient elution was realized with the binary mobile phase of acetonitrile containing 0.1% formic acid (A) and the aqueous solution of 0.1% formic acid (B), under various elution profiles at a flow rate of 18 μ L/min. To protect the column against contamination, it was rinsed after approximately 20 analyses with pure acetonitrile for 1 h, to remove less polar substances.

The MS–MS measurements were performed in the MRM mode, using ESI in the positive mode. Nitrogen was used as the collision, nebulizing and desolvating gas.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the MS–MS conditions

All the instrumental MS–MS parameters have been optimized in a standard way. After injection of methanolic solutions of standards (100 ng/ml) into the ion source by the syringe pump, two most intense characteristic molecular fragments were selected by tuning the values of the fragmentor voltage (from 10 to 350 V) in MS2 SIM mode and the collision energy (from 10 to 250 V) in product ion mode. The resultant values are listed in Table 1. To maximize the signals in the MRM mode, the following parameters were tuned over the following ranges: capillary spray voltage, 1500–6000 V, the nebulizer pressure, 2–15 psi, the drying gas temperature, 250–350 $^{\circ}$ C, and the drying gas flow rate, 5–15 L/min. The optimized ESI(+) conditions were: the capillary voltage, 5500 V,

Table 1
MRM conditions used for cLC–MS–MS determination of estrogens (ESI, positive mode).

Analyte	Precursor ion	Product ion	Fragmentor (V)	Collision energy (V)
E3	271.0	252.9	110	10
β E2	255.0	158.9	120	15
α E2	255.0	158.9	120	15
EE2	279.0	132.9	120	10
E1	271.0	252.9	110	10

the nebulizer pressure, 12 psi, the gas temperature, 350 °C, and the nitrogen flow-rate, 10 L/min.

3.2. Optimization of cLC–MS–MS for determination and quantitation of target estrogens

The estrogens studied are medium polar or nonpolar acidic substances, whose log K_{ow} values lie within an interval of 2.45–3.13, in dependence on their structures [19]. Their HPLC–MS analyses mostly employ reversed-phase systems with C18 or C8 stationary phases and mobile phases containing methanol or acetonitrile organic modifiers and aqueous basic components (e.g., NH_3 and its salts), combined with the negative-mode ionization. However, application of a basic mobile phase to the silica-based stationary phases is often unsuitable because of the danger of silica gel dissolution, which is more pronounced with capillary columns than with standard HPLC ones. Therefore, at the beginning of the cLC study, ESI in the negative mode in combination with acidic mobile phase was tested but the signals attained for the test analytes were very low and noisy. This was one of the reasons for the selection of the acidic mobile phase in combination with the positive ESI mode.

To develop a miniaturized cLC procedure for determination of trace amounts of free estrogens in aqueous matrices, the Zorbax SB C18 capillary column was selected, as it is recommended for separations in solutions of very low pH values where it should provide a high stability, good reproducibility of the results and good peak symmetry, especially for acidic analytes. A binary mixture of acetonitrile and water, containing 0.1% formic acid in both the components, was used as the mobile phase. The system was optimized under the conditions of isocratic elution, following the effect of the acetonitrile content, within a range from 25 to 45 vol.%, on the retention, separation and the degree of ionization of all the five analytes in the positive ionization mode. The optimum composition of the mobile phase, from the points of view of a sufficient retention of the most polar analyte, estriol, an acceptable resolution of all the estrogens and a sufficient detection sensitivity, was found to be 38/62 (v/v) ACN/water mixture containing 0.1% formic acid. The time of analysis did not exceed 13 min. In contrast to the spiked deionized water, the retention of estriol, contained in a methanolic eluate after the preconcentration from environmental water samples, was insufficient under the isocratic conditions, due to the poor baseline in the beginning of the separation. A decrease in the acetonitrile content led to prolonging of the estriol retention, but the resolution of 17β - and 17α -estradiols became poorer. Therefore, gradient elution was applied. Various gradient profiles were tested and the optimized one started with 26% A which was increased to 38% within 3 min, maintained constant for 2 min, increased again to 42% within 3 min, maintained constant for 8 min, and finally returned to 26% within 1 min. All the compounds were eluted within 14 min and the total run time was 17 min. This gradient profile was applied to all the following analyses. An example of the separation under the optimized gradient elution conditions is depicted in Fig. 2.

3.3. SPE extraction

The SPE preconcentration was optimized considering the SPE sorbent type, the sample volume, the sample flow rate, the elution solvent and its flow rate. For each type of commercial SPE cartridge, the volume of deionized water (10–500 ml) was optimized, spiked with the analytes at a concentration of 50 ng/L. The spiked deionized water was applied to the cartridges at various flow rates (0.8–1.5 mL/min) and several flow rates were tested for the elution of the analytes (0.5–1.2 mL/min). The volume of the solvent necessary for complete elution of the analytes (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mL) was determined for all the estrogens.

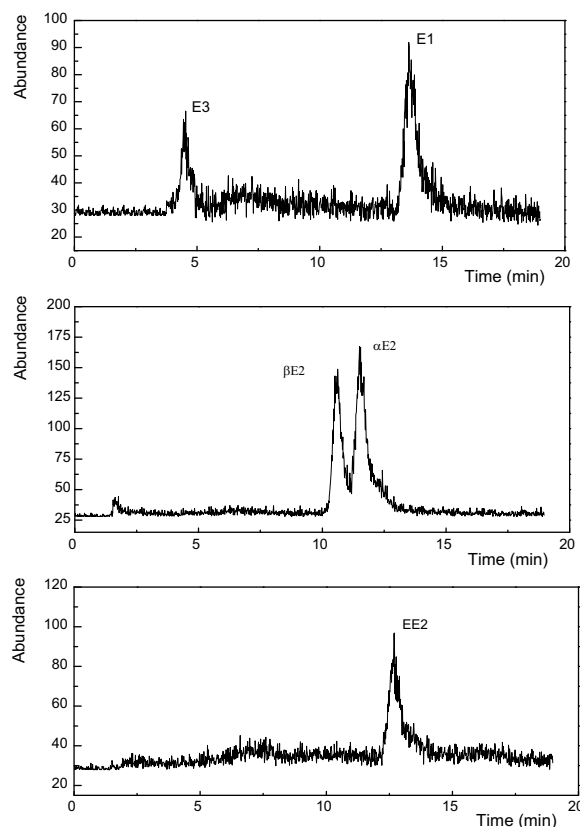


Fig. 2. MRM chromatograms of estrogens obtained for spiked river water (50 ng/L, Uhlava, Klatovy) under the optimized preconcentration and gradient elution conditions (see Sections 3.2 and 3.3, respectively).

The Sep-Pak C18 column exhibited very strong sorption of all the analytes, which were not eluted by the solvents tested (acetonitrile, methanol, ethyl acetate, acetone). To reduce the undesirable interactions of the analytes with the SPE packing, 0.5% of triethylamine was added to the elution solvent. Then, the analytes were partially eluted, but the yield did not exceed 30%. Therefore, this SPE column was no longer used and a new generation of SPE columns, namely, Discovery DSC-18 and DSC-18Lt, was tested. These cartridges permitted reversible sorption of all the analytes, the better results being provided by the monomeric-bound DSC-18Lt stationary phase, permitting a rapid elution of the analytes with pure methanol.

Under the optimized preconcentration conditions, namely, a Discovery DSC-18Lt column, 100 mL aqueous samples, a flow rate of 1 mL/min, elution with 0.5 mL of methanol at flow-rate of 1 mL/min, spiked deionized water was tested first. The results, obtained for three estrogen concentration levels, 25, 50 and 250 ng/L, are summarized in Table 2 (columns a–c). It can be seen that the yield generally amounts to 95–100%, with a very good repeatability (the RSD values up to 5.9%).

The Uhlava river water, coming from an unpolluted area, was selected as the environmental aqueous sample. The samples were collected close to the town of Klatovy, 50 km apart from the river spring. The preconcentrated, unspiked Uhlava river sample (Klatovy) was found to be free of the studied estrogens and was used as the environmental blank. Spiked at 25, 50 and 250 ng/L, Uhlava river water was preconcentrated and the extraction yield determined; the results are presented in Table 2 (columns d–f). The yields are in

Table 2

Recoveries and relative standard deviations (%RSD, $n=3$) of the studied estrogens obtained for spiked deionized^{a,b,c} and river water^{d,e,f} (Uhlava, Klatovy), experimental conditions: samples eluted with 0.5 mL methanol, cLC analysis under the optimized gradient elution (for details, see Section 3.2).

Analyte	% ^a	RSD ^a	% ^b	RSD ^b	% ^c	RSD ^c	% ^d	RSD ^d	% ^e	RSD ^e	% ^f	RSD ^f
E3	95	5.8	98	3.5	97	4.0	95	7.2	96	5.3	96	6.1
βE2	98	5.2	100	3.0	100	4.0	98	6.5	100	2.2	100	3.3
αE2	97	5.9	100	3.0	99	4.0	98	5.1	99	2.5	99	3.4
EE2	98	5.4	99	3.3	98	4.2	97	5.3	98	3.2	98	3.9
E1	96	4.6	98	3.4	97	4.3	95	5.1	98	3.5	96	4.3

^a 100 mL deionized water spiked at 250 ng/L.

^b 100 mL deionized water spiked at 50 ng/L.

^c 100 mL deionized water spiked at 25 ng/L.

^d 100 mL river water spiked at 250 ng/L.

^e 100 mL river water spiked at 50 ng/L.

^f 100 mL river water spiked at 25 ng/L.

Table 3

Parameters of the calibration curves (standard deviations are in parentheses), limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) obtained for spiked deionized water; for mobile phase gradient and optimized preconcentration conditions see Sections 3.2 and 3.3, respectively. Linearity range of analytes used: from LOQ to 500 ng/L.

Compound	Slope (L/ng a.u.)	Intercept (a.u.)	Correlation coefficient	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
E3	10.21 (0.32)	−24.15 (1.87)	0.9998	4.7	17.3
βE2	43.55 (0.93)	−33.75 (3.28)	0.9996	3.9	7.3
αE2	60.42 (1.29)	−258.78 (9.09)	0.9985	3.0	6.1
EE2	37.86 (1.05)	−117.64 (5.62)	0.9998	3.4	12.3
E1	40.59 (2.33)	372.93 (32.75)	0.9989	5.4	15.8

the range of 95–100%, with a very good repeatability (the RSD values up to 6.5%, except for estriol). Comparing the results obtained for the deionized and river waters, it can be stated that the recoveries are higher than the values obtained with the commonly used SPE cartridges [11].

3.4. Quantitation

Under the optimized preconcentration and separation conditions, the calibration curves were measured for all the five estrogens in spiked distilled water and in spiked river water (Uhlava, Klatovy). The calibration curves were constructed in the concentration range from 10 to 500 ng/L, and the analytes were tested within a linearity range from LOQ of respective analyte to 500 ng/L. Each measurement of the peak area being carried out in triplicate. The results of the linear regression are listed in Table 3 (spiked deionized water) and Table 4 (spiked Uhlava river, Klatovy). The high correlation coefficients indicate a good agreement of the linear calibration with the results of the real sample analyses. Testing at a significance level of $1 - \alpha = 0.95$ demonstrates that the computed intercepts are statistically significantly different from zero.

The peak height–concentration dependences were treated by linear regression, to determine the limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ), as the triple and ten-times the noise level, respectively. It can be seen that the LOD and LOQ values, obtained for spiked deionized water (Table 3) are lower than for the river water matrix (Table 4). The LOD and LOQ values obtained for spiked river water are not exceeding 6.8 and 25.0 ng/L, respectively. The highest LOD and LOQ values were always obtained for estriol, which is eluted first, and for estrone, whose retention time is the longest.

The LOD and LOQ values are fully comparable with the published ones for HPLC on standard size columns and provide sufficient sensitivity for analyses of environmental aqueous samples [11].

3.5. Application to environmental samples

The optimized procedures for the analyte preconcentration and the subsequent analysis of the methanolic eluate using gradient elution were applied to six real aqueous samples collected between September 12 and December 14, 2009 at various sites, namely, Vltava river (Prague), the Botic stream (Prague), Uhlava river (Klatovy and Pilsen), wastewater entering and leaving the Imperial Island Prague WWTP. Each sample was preconcentrated in triplicate and analyzed. Only two samples yielded positive results for the presence of estrogens, namely, sample collected in the Vltava river (about 900 m beyond the Prague Central WWTP) and sample collected in the wastewater inlet stream into the WWTP on the Imperial Island in Prague. On the other hand, no estrogen was found in the outlet from the WWTP and in other Prague samples (the Botic stream). Samples from substantially less inhabited areas (Uhlava river, Klatovy and Pilsen) also yielded negative results.

The MRM chromatogram of the Vltava river sample (Prague) is given in Fig. 3, indicating the presence of 13.2 ng/L (RSD 5.5%) of 17β-estradiol. The wastewater inlet into the WWTP contained all the studied estrogens, except for 17α-estradiol. The concentrations (ng/L) were 20.5 for estrone (RSD 8.4%), 21.4 for 17β-estradiol (RSD 7.2%), 100.7 for 17α-ethynylestradiol (RSD 4.4%) and 188.6 for estriol (RSD 6.8%); the sum of estrogens was 371.4 ng/L. The repeatability of the whole procedure, including both the extraction step and the subsequent analysis of the real sample, expressed in terms of RSD ($n=9$), did not exceed 8.5%, which is a very good

Table 4

Parameters of the calibration curves (standard deviations are in parentheses), limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) obtained for spiked river water (Uhlava, Klatovy), for mobile phase gradient and optimized preconcentration conditions see Sections 3.2 and 3.3, respectively. Linearity range of analytes used: from LOQ to 500 ng/L.

Compound	Slope (L/ng a.u.)	Intercept (a.u.)	Correlation coefficient	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
E3	10.90 (0.53)	−37.26 (1.99)	0.9997	6.8	25.0
βE2	49.44 (1.99)	−57.89 (4.53)	0.9995	6.4	12.1
αE2	71.59 (2.65)	−348.46 (15.88)	0.9981	5.2	10.5
EE2	41.28 (2.24)	−140.99 (7.24)	0.9996	5.1	18.5
E1	43.77 (5.36)	435.38 (42.36)	0.9981	6.7	19.3

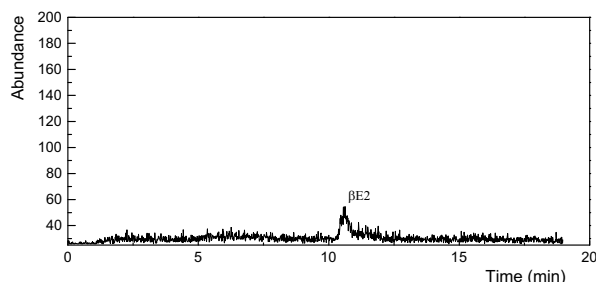


Fig. 3. A MRM chromatogram of the Vitava river sample obtained under the same conditions as those in Fig. 2. The peak corresponds to 17β -estradiol, its content is 13.2 ng/L.

result for an analysis of trace analytes in real samples. The RSD value depends on the character of the aqueous matrix and is higher for more polluted samples (compare the RSD values for 17β -estradiol obtained for the sample from the Vitava river and for that collected in the WWTP inlet). To test the suitability of the whole developed analytical procedure to the samples with more complex matrices, the wastewater samples from the inlet and outlet of the WWTP were spiked with all the studied estrogens at a level of 50 ng/L. The increased estrogen concentrations found in the spiked samples corresponded to the amount of the analytes added, demonstrating unchanged recoveries and the absence of any matrix-induced ion suppression during the detection.

The results obtained correspond to those published for classical HPLC analyses. The detection limits for HPLC–MS–MS analyses range from units of ng/L to tens of ng/L for free estrogens [11] and this fully agrees with the LOD values obtained in the present study. The estrogen contents in river and waste waters found by us are also comparable to the results published for Japanese and Spanish rivers and wastewaters or surface water of the Baltic Sea [11,20,24,29,33,38]. The negative results obtained for the outlet from the Prague WWTP document an efficient removal of estrogen pollutants from the water treated.

4. Conclusions

A new, miniaturized separation procedure, employing capillary liquid chromatography hyphenated with the MS–MS detection, has been developed for the determination of five important estrogen pollutants in natural waters, including the poorly separable isomeric pair of 17α - and 17β -estradiols. The optimized preconcentration and separation conditions permit the attainment of very low LOD and LOQ values, of the order of units to tens of ng/L, in aqueous matrices, permitting the determination of traces of the studied estrogens in samples of environmental waters. The use of new SPE materials permits a single-step preconcentration of all the estrogens with a high yield, close to 100%. These results, based on the advantage of a low solvent consumption in cLC and on the combination of the positive ionization ESI mode with a column friendly acidic mobile phase, predetermine this method for application in estrogen screening and series analyses.

Acknowledgements

Financial support from the Ministry of Education of the Czech Republic, the projects Centrum No. 1M06011, 285411 and from the long-term research plan of the Ministry of Education of the Czech Republic, No. MSM0021620857, are gratefully acknowledged. Supported by a grant from Norway through the Norwegian Financial Mechanism (Project CZ0116).

References

- [1] T. Colborn, F.S.V. Saal, A.M. Soto, *Environ. Health Perspect.* 101 (1993) 378.
- [2] C.R. Tyler, S. Jobling, J.P. Sumpter, *Crit. Rev. Toxicol.* 28 (1998) 319.
- [3] S. Jobling, M. Nolan, C.R. Tyler, G. Brighty, J.P. Sumpter, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2498.
- [4] F. Eertmans, W. Dhooge, S. Stuyvaert, F. Comhaire, *Toxicol. In Vitro* 17 (2003) 515.
- [5] R.M. Sharpe, *Phil. Trans. R. Soc.* 365 (2010) 1697.
- [6] J. Peknicova, V. Kyselova, D. Buckiova, M. Boubelik, *Am. J. Reprod. Immunol.* 47 (2002) 311.
- [7] K. Dvorakova-Hortova, M. Honetschlagerova, E. Tesarova, J. Vasinova, M. Frolíkova, Z. Bosakova, *Folia Zool.* 58 (2009) 75.
- [8] H. Andersen, H. Siegrist, B. Halling-Sorensen, T. Ternes, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 4021.
- [9] S. Reddy, C.R. Iden, B.J. Brownawell, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7032.
- [10] G.H. Panter, R.S. Thomson, N. Beresford, *Chemosphere* 38 (1999) 3579.
- [11] V. Pacakova, L. Loukotkova, Z. Bosakova, K. Stulik, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 867.
- [12] M.J.L. de Alda, D. Barcelo, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 437.
- [13] R.W. Giese, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 401.
- [14] M. Petrovic, M.D. Hernandez, M.S. Diaz-Cruz, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 1.
- [15] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J.L. de Alda, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 23.
- [16] P. Labadie, E.M. Hill, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 174.
- [17] M. Petrovic, S. Tavazzi, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 971 (2002) 37.
- [18] D. Matejcek, P. Houserova, V. Kuban, *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 80.
- [19] K. Hajkova, J. Pulkrabova, J. Schurek, J. Hajslova, J. Poustka, M. Napravnikova, V. Kocourek, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1351.
- [20] T. Isobe, H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki, M. Morita, *J. Chromatogr. A* 984 (2003) 195.
- [21] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marce, *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 224.
- [22] M. Pedrouzo, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marce, *Talanta* 78 (2009) 1327.
- [23] M.J.L. de Alda, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 145.
- [24] M. Farre, M. Kuster, R. Brix, F. Rubio, M.J.L. de Alda, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 166.
- [25] Y. Suzuki, T. Maruyama, *Water Res.* 40 (2006) 1061.
- [26] T.A. Ternes, H. Andersen, D. Gilberg, M. Bonerz, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3498.
- [27] J.D. Stuart, *Adv. Chromatogr.* 45 (2007) 245.
- [28] A. Penalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marce, *J. Chromatogr. A* 964 (2002) 153.
- [29] K. Mitani, M. Fujioka, H. Kataoka, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 218.
- [30] J.F. Hsu, Y.C. Chang, T.H. Chen, L.C. Lin, P.C. Liao, *J. Chromatogr. B* 860 (2007) 49.
- [31] Y. Watabe, T. Kubo, T. Nishikawa, T. Fujita, K. Kaya, K. Hosoya, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 252.
- [32] M.S. Diaz-Cruz, M.J.L. de Alda, R. Lopez, D. Barcelo, *J. Mass. Spectrom.* 38 (2003) 917.
- [33] I.C. Beck, R. Bruhn, J. Gandrass, W. Ruck, *J. Chromatogr. A* 1090 (2005) 98.
- [34] G. Morteani, P. Moller, A. Fuganti, T. Paces, *Environ. Geochem. Health* 28 (2006) 257.
- [35] D. Matejcek, V. Kuban, *J. Chromatogr. A* 1192 (2009) 248.
- [36] P. Sandra, in: 14th International Symposium on Separation Science, New Achievements in Chromatography, September 30 to October 3, Primošten, Croatia, Croatian Society of Chemical Engineers, 2008, p. 7.
- [37] P. Coufal, Z. Bosakova, E. Tesarova, B. Kafkova, J. Suchankova, J. Barbe, *J. Chromatogr. B* 770 (2002) 183.
- [38] M. Sole, M.J.L. de Alda, M. Castillo, C. Porte, K. Ladegaard-Pedersen, D. Barcelo, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 5076.

4 HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE A CHARAKTERIZACE SEPARAČNÍCH SYSTÉMŮ

4.1 Teoretický úvod

4.1.1 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie je metoda kapalinové chromatografie, která byla vyvinuta s cílem nalézt vhodnou metodu k separaci velmi polárních látek, jejichž analýza v posledních několika letech nabývá na důležitosti, a které jsou velmi špatně analyzovatelné v jiných separačních módech [1]. Problematické jsou především látky z oblasti bioanalýzy, proteomiky, metabolomiky, toxikologie, farmaceutického průmyslu aj.

Název hydrofilní interakční kapalinová chromatografie se svou zkratkou HILIC byla poprvé navržena Alpertem v roce 1990 [2] pro separační systém, kde se uplatňují interakce směsi aminokyselin s hydrofilní stacionární fází s následnou elucí poměrně hydrofobní mobilní fází s určitým zastoupením vodné složky. Nicméně tato separační technika byla použita již v roce 1975 při separaci sacharidů a oligosacharidů za použití aminoskupinami modifikovaného silikagelu jako stacionární fáze a směsi acetonitrilu s vodou v různém objemovém zastoupení jako mobilní fáze [3].

Pro HILIC je typické použití hydrofilní stacionární fáze a mobilní fáze s vysokým podílem organické složky. Nejčastěji se používá acetonitril s objemovým obsahem v rozmezí 60 až 96 %. Oproti reverznímu chromatografickému módu má vodná složka mobilní fáze vyšší eluční sílu. Eluční pořadí analytů je shodné jako u normálního chromatografického módu [4].

Hlavní výhody HILIC, kromě vyšší retence polárních látek, jsou následující: zvýšení citlivosti v MS detekci z důvodu vyššího obsahu organické složky v mobilní fázi, symetričtější tvary píků bazických látek, možnost přímého dávkování organického eluentu po SPE, možnost použití vyšších průtoků mobilní fáze vzhledem k vyššímu obsahu organické složky v mobilní fázi. Mezi další výhody HILIC patří možnost

nahrazení normálního chromatografického módu, který má řadu nevýhod jako např. komplikované spojení s MS detekcí [1, 5-9].

4.1.1.1 Mechanismus separace

Mechanismus separace v HILIC je stále nedořešeným a diskutovaným tématem, kterým se zabývá řada publikací [10-18]. Jedny z prvních studií, které se snažily popsat separační mechanismus v HILIC, předpokládaly, že retence v HILIC je řízena interakcí hydroxylových skupin studovaných analytů s polárními skupinami stacionární fáze [19, 20]. Stejně tak, jako v normálním chromatografickém módu, předpokládaly, že retence je řízena pouze adsorpcí analytů na povrchu stacionární fáze. Tato teorie byla omezena tím, že se týkala pouze analytů, které ve své struktuře obsahují hydroxylové skupiny, a proto nenašla širší uplatnění. Po experimentech se separací směsi cukrů na samotném silikagelu a na silikagelu derivatizovaném různými aminy byl prokázán i mechanismus rozdělování [21-23].

Komplexnější pohled na separační mechanismus v HILIC vnesl v roce 1990 Alpert [2]. Podle Alperta jsou na polární skupiny stacionární fáze sorbovány molekuly vody z mobilní fáze, které vytvoří vodný film na povrchu stacionární fáze. Analyty jsou na základě své polaritě rozdělovány mezi vodnou vrstvu na povrchu stacionární fáze a mobilní fázi, která obsahuje malé množství vodné složky. Čím jsou analyty polárnější, tím mají větší afinitu k vodné vrstvě navázané na povrchu stacionární fáze oproti mobilní fázi bohaté na organickou složku, což se projeví ve zvýšení jejich retence [2].

Ve svém článku Hemström a Irgum ukázali, že při zvyšujícím se obsahu vodné složky v mobilní fázi dochází ke stírání rozdílů mezi vodnou vrstvou na povrchu stacionární fáze a vodnou složkou v mobilní fázi. To má za následek zvýšení rozpustnosti polárních analytů v mobilní fázi, což se projeví snížením jejich retence. Retence je tedy přímo úměrná polaritě studovaných látek a nepřímo úměrná polaritě mobilní fáze [1].

V řadě publikací bylo prokázáno, že na separačním mechanismu v HILIC se podílejí také slabé vazebné interakce jako elektrostatické interakce, vodíkové interakce nebo dipól-dipól interakce [14, 24-27].

V současné době je separační mechanismus v HILIC stále diskutovaným tématem. Z dosavadních výzkumů je zřejmé, že se jedná o multimodální proces, kdy se při retenci polárních látek uplatňuje jak rozdělování mezi vodnou vrstvu na povrchu stacionární fáze a mobilní fázi, tak i adsorpce na povrchu stacionární fáze [1]. Retenční mechanismus v HILIC se může lišit pro odlišné látky a v závislosti na použité stacionární a mobilní fázi [13, 28].

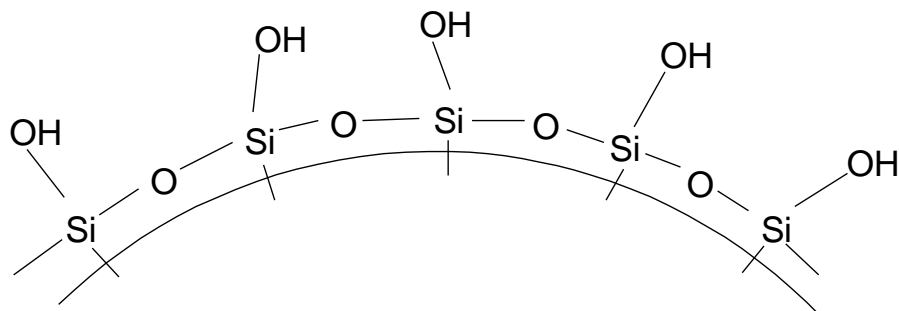
4.1.1.2 Stacionární fáze

V HILIC může být použita jakákoliv polární stacionární fáze, která je schopna na svém povrchu vytvořit vodnou vrstvu. Mohou být použity polární kolony s iontovými i neiontovými polárními skupinami vázanými na povrch silikagelu nebo organických polymerních matric [15]. Jedním z nejpoužívanějších materiálů v HILIC separacích je nederivatizovaný silikagel [29-37]. HILIC separace využívají také stacionární fáze s chemicky vázanými skupinami jako aminopropylové skupiny [38-41], amidové [42-44], diolové [45, 46], cyklodextrinové [47] a jiné. Přehled stacionárních fází používaných v HILIC je uveden v přehledném článku Jandery [15].

V této části dizertační práce zaměřené na HILIC byly použity následující stacionární fáze: nederivatizovaný silikagel, na silikagel vázaný nativní cyklofruktan a cyklofruktan derivatizovaný isopropylenem, amidové a sulfobetainová stacionární fáze.

4.1.1.2.1 Nederivatizované silikagelové stacionární fáze

Silikagelové stacionární fáze jsou na trhu k dostání téměř od každého výrobce chromatografických kolon. Komerčně dostupné silikagelové stacionární fáze se mohou lišit v čistotě použitého silikagelu a ve způsobu přípravy stacionární fáze. V závislosti na výše zmíněných parametrech mohou silikagelové stacionární fáze od různých výrobců poskytovat různou retenci, účinnost a tvar píků [15]. Na obrázku 4.1 je uvedena struktura nederivatizované silikagelové stacionární fáze [4].



Obrázek 4.1 Struktura nederivatizované silikagelové stacionární fáze [4].

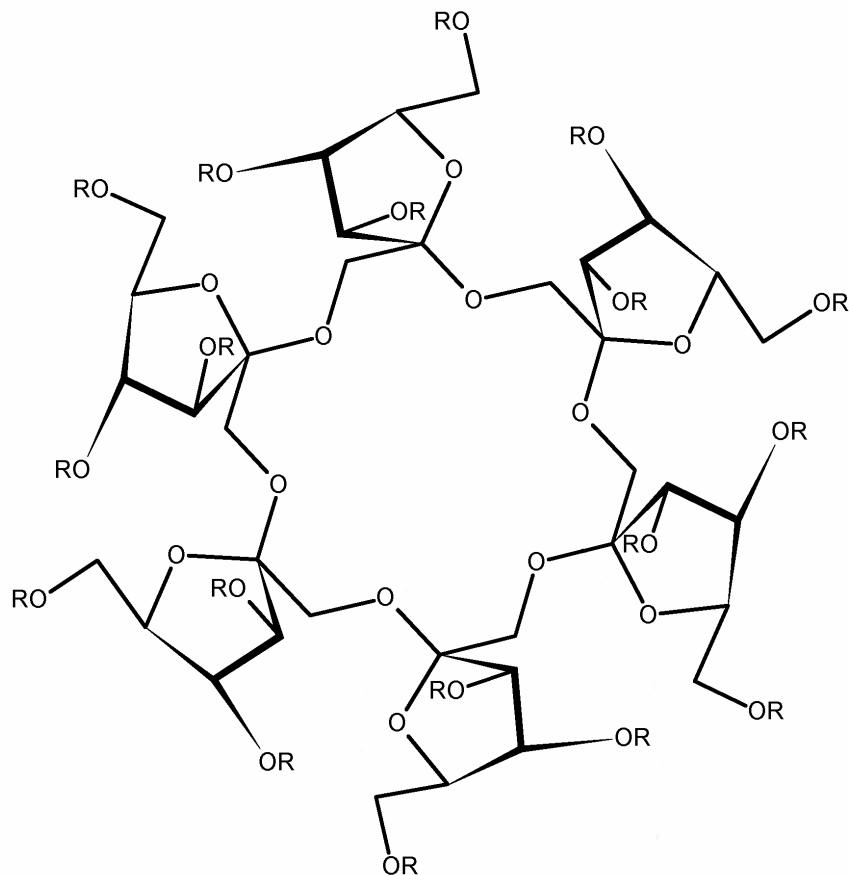
V závislosti na studovaném analytu, složení mobilní fáze a vlastnostech použitého silikagelu se na separačním mechanismu může podílet rozdělování, adsorpce a iontově-výměnné interakce [15]. Při použití pufru o vyšším pH bude docházet k disociaci silanolových skupin, což může způsobit, že iontově výměnná-interakce se bude velmi významně podílet na separačním mechanismu, zvláště pokud budou separovány pozitivně nabitě bazické látky [48].

Výhodou nederivatizovaných silikagelových stacionárních fází oproti chemicky modifikovaným je jejich vyšší stabilita, která se pozitivně projevuje hlavně ve spojení LC-MS, kdy nedochází ke kontaminaci MS uvolněnými ligandy [49]. Hlavní nevýhody nederivatizovaných silikagelových stacionárních fází, které byly zaznamenány v literatuře, jsou velmi silná retence (často ireverzibilní) bazických látek díky elektrostatickým interakcím [50], nereprodukovatelné výsledky [4], špatná symetrie píků některých sloučenin [23] a snadné předávkování kolony [1, 49].

4.1.1.2.2 Cyklofruktanové stacionární fáze

Cyklofruktany jsou cyklické oligosacharidy skládající se ze šesti nebo více D-fruktofuranozových jednotek, navzájem propojených β -(2 \rightarrow 1) vazbou (běžně se používají zkratky CF6, CF7, CF8, které označují počet fruktofuranozových jednotek v makrocyclickém kruhu). Cyklofruktany tvoří centrální „crown“ etherovou strukturu. Každá fruktofuranozová jednotka obsahuje jednu primární a dvě sekundární

hydroxylové skupiny. Tyto hydroxylové skupiny se často využívají k derivatizaci nativních cyklofruktanů. Struktura cyklofruktanu je uvedena na obrázku 4.2 [51].



Obrázek 4.2 Struktura cyklofruktanu 6. R = H nebo derivatizační skupina [51].

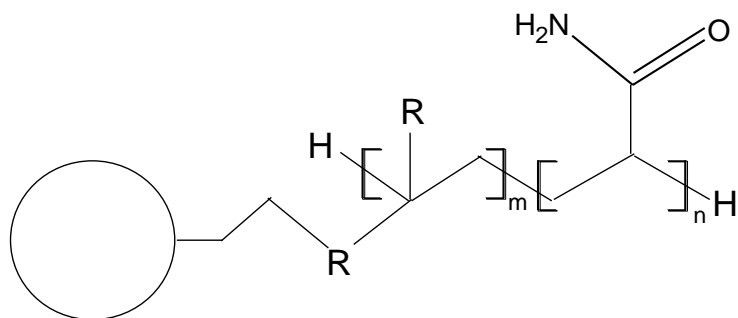
První zmínka o cyklofruktanech je datována do roku 1989, kdy byla zaznamenána produkce cyklofruktanů při fermentaci inulínu za použití extracelulárního enzymu z *Bacillus circulans* [52]. Cyklofruktany byly nejprve používány jako aditiva do různých produktů např. do jídla (potlačení hořkosti) [53], či excipienty ve farmaceutickém průmyslu [53]. Cyklofruktany jako chirální selektory v HPLC byly představeny v roce 2009 profesorem Armstrongem [53]. Od té doby našly cyklofruktany využití v řadě chirálních separací [54-60].

Vzhledem ke své struktuře a polárnímu charakteru mohou být cyklofruktanové stacionární fáze využity také v HILIC separacích. První použití nativní cyklofruktanové stacionární fáze v HILIC separaci bylo uskutečněno skupinou Armstronga [51]. Nativní cyklofruktan byl úspěšně použit k separaci nukleových kyselin, nukleosidů, xantinů, β -blokátorů, kyseliny salicylové a jejích derivátů [51]. K chirální i achirální separaci řady polárních látek v HILIC módu (xantiny, β -blokátory, vitamíny, aminokyseliny, maltooligosacharidy a jiné) byl použit v roce 2011 cyklofruktan derivatizovaný sulfonovými skupinami [27]. Isopropylovaný cyklofruktan byl prvně použit v HILIC v publikaci Kozlíka a kol. [26].

4.1.1.2.3 Amidové stacionární fáze

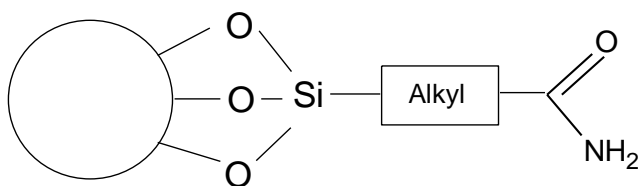
Amidové stacionární fáze obsahují karbamoylové nebo amidové skupiny vázané na silikagelu pomocí krátkého alkylového řetězce [15]. Oproti aminopropylovým skupinám vázaným na silikagelu nemají amidové stacionární fáze bazický charakter, tudíž se v separačním mechanismu méně uplatňují iontově-výměnné interakce [15]. U amidových kolon byla publikována jejich dlouhodobá životnost [4, 15]. HILIC na amidových kolonách byla použita hlavně pro separaci peptidů, oligosacharidů, glykoproteinů a glykosidů [4, 9, 15, 50, 61].

Některé amidové stacionární fáze byly speciálně vyrobeny pro použití v HILIC, jako HILIC TSK gel Amide-80, která se úspěšně uplatnila pro separaci monosacharidů, oligosacharidů, peptidů a aminokyselin [15, 62]. Amide-80 vykazuje vyšší retenci pro řadu polárních látek ve srovnání s nederivatizovaným silikagelem a ostatními polárními stacionárními fázemi za stejných separačních podmínek [12]. Struktura funkční skupiny kolony TSK gel Amide-80 je uvedena na obrázku 4.3 [63].



Obrázek 4.3 Struktura funkční skupiny kolony TSK gel Amide-80 [63].

Další amidovou kolonou, která je určena pro HILIC separace, je kolona XBridge™ Amide. Tato kolona je založena na BEH technologii (bridged ethylene hybrid), která je patentována firmou Waters. Princip BEH technologie spočívá v tom, že mezi silanolové skupiny jsou vloženy hybridní ethylenové můstky, které fungují jednak jako „endcappingové“ skupiny, ale také zpevňují celkovou strukturu takto připravené silikagelové fáze [64]. To způsobuje jednak vyšší mechanickou odolnost potřebnou např. v UHPLC, tak i vysokou odolnost chemickou. A proto lze na takovýchto kolonách pracovat v širokém rozsahu hodnot pH [64, 65]. Navíc jsou kolony založené na BEH technologii odolné vůči tzv. „krvácení kolony“ (z anglického bleeding), nebo-li vymývání ligandu z nosné fáze [65]. Kolona XBridge™ Amide byla použita v řadě HILIC separacích [66-68]. Struktura funkční skupiny kolony XBridge™ Amide je uvedena na obrázku 4.4 [69].

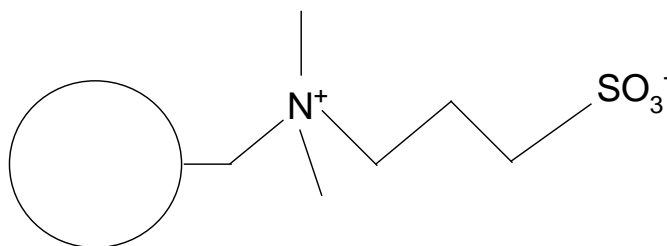


Obrázek 4.4 Struktura funkční skupiny kolony XBridge™ Amide [69].

4.1.1.2.4 Sulfoalkylbetainové stacionární fáze

Sulfoalkylbetainové stacionární fáze patří do skupiny zwitteriontových stacionárních fází, které byly původně zamýšleny k použití v iontově-výměnných separacích [15]. První použití sulfoalkylbetainových stacionárních fází v HILIC separacích bylo uskutečněno při analýzách anorganických solí, malých organických iontových látek a proteinů [70-73].

Zwitteriontová sulfoalkylbetainová stacionární fáze obsahuje jako funkční skupinu sulfoalkylbetain (3-sulfopropyldimethylalkylamoniová sůl), obsahující zároveň silně kyselou sulfonovou skupinu a silně bazickou kvartérní amoniovou skupinu, které jsou vzájemně oddělené krátkým alkylovým řetězcem. Toto uspořádání umožňuje současnou separaci aniontových a kationtových látek. Struktura funkční skupiny sulfoalkylbetainové stacionární fáze je uvedena na obrázku 4.5 [74].



Obrázek 4.5 Struktura funkční skupiny sulfoalkylbetainové stacionární fáze (kolona ZIC-HILIC) [74].

Sulfoalkylbetainové stacionární fáze na svém povrchu velmi silně adsorbují vodu z mobilní fáze. Polární interakce hrají hlavní úlohu v separačním mechanismu na těchto stacionárních fázích, slabé elektrostatické interakce dodávají významnou selektivitu při separaci iontových látek [15]. Sulfoalkylbetainové stacionární fáze jsou na trhu známy pod komerčními názvy ZIC-HILIC (obsahuje sulfoalkylbetain vázaný na silikagelu) a ZIC-*p*HILIC (obsahuje sulfoalkylbetain vázaný na polymeru). ZIC-HILIC kolony jsou široce používány k separaci řady polárních látek, jako jsou metabolity [75, 76], peptidy [77], glykoproteiny [78] a jiné polární látky [79-81].

4.1.2 Charakterizace separačních systémů

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jednou z nejrozšířenějších analytických technik. Neustálý vývoj v HPLC vede k tomu, že se na trhu objevují nové stacionární fáze s různými vlastnostmi. Výběr vhodné stacionární fáze je nejdůležitějším krokem pro úspěšnou separaci jakéhokoliv vzorku. Znamé technické parametry chromatografických kolon nejsou ve většině případů postačující k výběru optimální kolony pro konkrétní separaci [82]. Z tohoto důvodu je žádoucí nalézt vztah mezi chemickou strukturou analytu a fyzikálně-chemickými vlastnostmi stacionárních fází, které by poskytly hlubší pochopení separačního procesu a tím usnadnily vývoj chromatografických metod.

Existuje celá řada testů sloužících k charakterizaci chromatografických kolon. Většina testů byla navržena a zároveň aplikována pro stacionární fáze používané v reverzním chromatografickém módu. Mnoho testů lze úspěšně aplikovat i v jiných chromatografických módech, jako například v HILIC [14, 83, 84]. Mezi základní charakteristiky se řadí určování fyzikálně chemických vlastností stacionární fáze, jako je tvar, homogenita a velikost částic stacionární fáze, specifický povrch, velikost pórů a jiné. Stanovení těchto vlastností a jejich následná kontrola ve výrobním procesu je nutná k přípravě dobře definovaných chromatografických kolon, které poskytují reprodukovatelné výsledky pro různé šarže dané kolony. Různé přístupy charakterizace fyzikálně chemických vlastností stacionární fáze byly diskutovány v řadě publikací [85-87].

Také spektrometrické metody přispívají svým dílem k charakterizaci chromatografických kolon. Jedná se hlavně o infračervenou spektroskopii (IČ) a nukleární magnetickou rezonanci (NMR). IČ spektroskopie je vhodná k charakterizaci silikagelového povrchu a určení obsahu volných silanolových skupin [88]. NMR se používá k určení typu chemicky vázaného ligandu na povrchu stacionární fáze, dále je schopna rozeznat, jakým způsobem je ligand navázán na povrch stacionární fáze a určit různé typy silanolových skupin [88].

K charakterizaci chromatografických kolon se používají i statistická vyhodnocení chromatografických dat. Používá se převážně analýza hlavních komponent (PCA) a faktorová analýza, které jsou schopny zařadit danou chromatografickou kolonu, podle

retenčního chování vybraných látek na dané koloně, do skupiny kolon s podobnými chromatografickými vlastnostmi. To umožňuje jednodušší a rychlejší rozhodování jakou chromatografickou kolonu zvolit pro danou aplikaci [89, 90]. Termodynamické změny entalpie a entropie spojené s přechodem analytu z mobilní fáze do fáze stacionární jsou hodnoceny pomocí van't Hoffovy závislosti [91, 92].

Mezi další testovací metody můžeme zařadit různé empirické testy jako je například Tanakův test [93], Engelhardův test [94], Waltersův test [95] a jiné. Pro tyto testy je typické, že získaná chromatografická informace je závislá na testovaných analytech, pomocí nichž lze popsat určitou vlastnost kolony (např. silanolová aktivita a hydrofobicita). Tyto testy jsou zejména vhodné pro vzájemné porovnání stacionárních fází [88]. Dále se mezi chromatografické testovací metody řadí různé chromatografické modely, které se snaží o bližší a komplexnější popis retenčního chování vybraných analytů, například Horváthův model [96], Galushkův model [97], model lineárních vztahů volných energií (LFER) [55] a jiné.

4.1.2.1 Modely lineárních vztahů volných energií

Modely lineárních vztahů volných energií jsou založeny na měření určité veličiny vztažené ke změně Gibbsovy energie při daném procesu (např. rozpouštění, retence aj.) [98].

Mezi tyto modely se řadí kvantitativní vztah mezi strukturou a účinností (QSAR – quantitative structure-activity relationship) [99]. Model QSAR byl navržen v šedesátých letech dvacátého století Hanschem a Fujitou [100, 101]. QSAR model našel uplatnění především ve farmakologii a toxikologii k predikci účinku léčivých látek, jejich distribuci a eliminaci v organismu [99]. Kvantitativní vztah mezi strukturou a retencí QSRR je založen především na korelaci retence analytu v chromatografickém systému s rozdělovacím koeficientem mezi *n*-oktánolem a vodou ($\log P$) [99].

Výhoda modelu LFER spočívá ve schopnosti tohoto modelu charakterizovat a porovnat celý chromatografický systém (mobilní a stacionární fázi). Model LFER je schopen poskytnout kvalitativní i kvantitativní informace o molekulárních interakcích podílejících se na retenci a separaci v daném chromatografickém systému. Mezi

molekulární interakce patří elektrostatické interakce, vodíková vazba, interakce na bázi přenosu náboje, disperzní síly [98, 102].

V kapalinové chromatografii dochází při retenci k přenosu analytu mezi stacionární a mobilní fází, což je spojeno se změnou Gibbsovy energie. Změna Gibbsovy energie může být rozdělena na příspěvky jednotlivých nezávislých typů molekulárních interakcí zodpovědných za retenci [103]. Rovnice LFER, která byla představena Abrahamem [104], vyjadřuje korelaci logaritmů retenčních faktorů s fyzikálně-chemickými parametry analytů (viz. rovnice (1)).

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1)$$

Význam jednotlivých členů rovnice je následující:

k...retenční factor

E...rozsah molární refrakce [105]

S...parametr dipolarity/polarizibility [105]

A...celková nebo efektivní acidita vodíkové vazby, popisuje proton donorovou schopnost analytu tvořit vodíkovou vazbu [104]

B...celková nebo efektivní bazicita vodíkové vazby, popisuje proton akceptorovou schopnost analytu tvořit vodíkovou vazbu [104]

V...McGowanův charakteristický objem solutu, popisuje disperzní a kohezivní interakce (schopnost tvorby kavity) analytu v chromatografickém systému [106]

c...úsek rovnice LFER, není vysvětlován pomocí solvatačních parametrů, zahrnuje všechny možné vlivy na retenci, které nejsou popsány pomocí regresních koeficientů

e...rozdíl ve schopnosti stacionární a mobilní fáze interagovat s *n*- a π -elektrony analytu

s...rozdíl v dipolaritě/polarizibilitě mezi stacionární a mobilní fází, poukazuje na schopnost fází účastnit se interakcí dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól

a...rozdíl v akceptorové bazicitě vodíkové vazby mezi stacionární a mobilní fází, schopnost působit jako akceptor vodíku pro vodíkovou vazbu

b...rozdíl v donorové aciditě vodíkové vazby mezi stacionární a mobilní fází, schopnost působit jako donor vodíku pro vodíkovou vazbu

v...rozdíl v hydrofobicitě mezi stacionární a mobilní fází, který závisí na rozdílu kohezivitu obou fází a na rozsahu disperzních interakcí mezi analytem a stacionární fází a analytem a mobilní fází

Velkými písmeny v rovnici 1 jsou označeny nezávisle proměnné (E , S , A , B , V). Jedná se o deskriptory, které popisují fyzikálně-chemické vlastnosti látek a kvantitativně popisují strukturní odlišnosti mezi nimi. Deskriptory pro širokou škálu látek lze spočítat, popřípadě zjistit pomocí nejrůznějších experimentálních technik [102]. V roce 1993 Abraham publikoval nové deskriptory pro velký počet sloučenin [107]. Tyto deskriptory jsou běžně používány v modelu LFER [24, 55, 108, 109]. Výběr analytů použitých v LFER modelu by měl být reprezentativní a analyty by měly být strukturně odlišné, aby rozložení hodnot jednotlivých deskriptorů bylo rovnoměrné a pokrývalo celou řadu vlastností analytů popsaných pomocí těchto deskriptorů [105].

Malými písmeny jsou označeny regresní koeficienty (e , s , a , b , v) získané multidimenzionální regresní analýzou [109]. Tyto regresní koeficienty popisují rozdíly dané molekulární interakce mezi stacionární a mobilní fází. Daná molekulární interakce je silnější mezi analytem a stacionární fází, pokud daný regresní koeficient nabývá kladné hodnoty, což se projeví jako zvýšení retence. Pokud je daný regresní koeficient záporný, pak daná molekulární interakce je silnější mezi analytem a mobilní fází, a vede tedy ke snížení retence. Výsledná retence je určena součtem všech jednotlivých nezávislých příspěvků [98, 102].

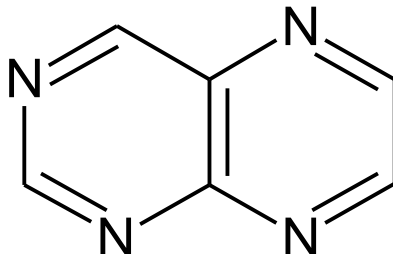
I když většina prací používajících LFER model je zaměřena na reverzní chromatografický mód, v posledních několika letech se objevily publikace, které aplikovaly LFER také na HILIC techniku [14, 24, 26, 84, 110-113].

4.1.3 Pteriny

První záznam o pterinech pochází z roku 1889, kdy Hopkins izoloval žlutý pigment z křídel různých druhů motýlů [114]. Skupina těchto pigmentů následně dostala obecný název pteriny podle řeckého slova „pteron“ (křídlo) [114]. Pteriny se nacházejí v řadě organismů, jako jsou obojživelníci, plazi, ryby, hmyz, a také člověk [115]. Jejich funkce je velmi rozmanitá v závislosti na organismu, ve kterém se vyskytují [114-116].

4.1.3.1 Chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti

Pteriny patří do skupiny heterocyklických sloučenin. Základní struktura pterinů je odvozena od bicyklického systému zvaného pteridin, jehož základem je pyrimidin a pyrazin. Struktura pteridinu je uvedena na obrázku 4.6.



Obrázek 4.6 Strukturní vzorec pteridinu.

Deriváty pteridinu se podle substituce pyrimidinového cyklu dělí na pteriny, což jsou deriváty 2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridinu a na lumaziny, což jsou deriváty 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropteridinu [117]. Dále mohou být deriváty pteridinu rozděleny podle velikosti substituentů na nekonjugované (s relativně malými substituenty, např. neopterin, biopterin, molybdopterin, onkopterin) a konjugované, které obsahují větší substituenty vázané na pteridinový cyklus (např. kyselina listová, riboflavin nebo methanopterin) [114, 117].

Pteriny jsou látky fotosenzitivní, což znamená, že na světle dochází k jejich rozkladu za vzniků různých derivátů pteridinu [114]. Pteriny se mohou vyskytovat v různých oxidačních stavech. Redukované formy pterinů snadno podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem, a to zejména v přítomnosti iontů kovů [114, 118]. Pro redukované formy pterinů je typické, že mají velmi silné antioxidační účinky a mohou *in vivo* velmi dobře působit jako lapače reaktivních forem kyslíku [118]. Oxidované formy pterinů vykazují silnou fluorescenci [118]. Pteriny se vyskytují v několika tautomerních formách. Mezi významné tautomerní formy se řadí laktamová a laktimová forma. Z důvodu nižší energetické náročnosti a vyšší stability je rovnováha mezi laktamovou a laktimovou tautomerní formou posunuta ve prospěch laktamové formy [119]. I když se pteridin velmi dobře rozpouští ve vodě a ve většině organických rozpouštědel, tak substituované pteridiny (oxo- a aminopteriny), které jsou asociovány intramolekulárními vodíkovými vazbami, vykazují velmi nízkou rozpustnost jak ve vodě, tak i v organických rozpouštědlech [120].

4.1.3.2 Význam a funkce

Pteriny a jejich deriváty zastávají řadu významných biologických funkcí. Podílejí se na řízení buněčného metabolismu, např. biopterin slouží jako redoxní kofaktor monooxygenas aromatických aminokyselin [121] a NO-synthasy [122]. Biopterin se také účastní řízení buněčného cyklu [123] a regulace melanogeneze [124]. Neopterin je velmi významným indikátorem řady onemocnění. Jeho zvýšená koncentrace v tělních tekutinách (moč a krevní plazma) je ukazatelem řady zánětlivých stavů a imunitních onemocnění, jako jsou například různá virová onemocnění, revmatoidní artritida a atopické astma [125-127].

Relativně vysoké koncentrace derivátů pteridinu se nacházejí ve formě pigmentů u hmyzu, plazů, obojživelníků, krabů a mořského planktonu [115, 128]. Pteriny propůjčují hmyzu typické zabarvení jejich kutikul počínaje od bílé barvy (leukopterin), přes červenou (erythropterin) a žlutou (xanthopterin) až po fluorescenční modrou (biopterin) [129]. Zbarvení způsobené pteriny často slouží jako ochranné zbarvení, které

může být rozděleno na varovné zbarvení (aposematické) a maskovací zbarvení (kryptické) [130, 131].

Aposematismus je antipredační strategie živočicha, která pomocí výstražných signálů informuje predátory o své nevýhodnosti [130]. Cílem těchto výstražných signálů je odradit potenciálního predátora od útoku. Proto by měly být tyto signály dobře srozumitelné a umožnit tak predátorovi jejich snadné rozeznání a dlouhodobé zapamatování [132]. Organismy využívají různé strategie, jimiž se před predátory brání, a to zejména optické, pachové nebo zvukové. Optické signály jsou nejběžnější, jsou založeny na různých variacích barvy, vzoru, kontrastu vůči podkladu, vnitřnímu kontrastu mezi různě zbarvenými partiemi těla, tvaru těla, velikosti, symetrie apod. [132].

V této práci bylo studováno zbarvení kutikul způsobené pteriny v ploštících (Heteroptera). Byly studovány dva druhy, a to *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* z různých lokalit a v různých vývojových stádiích. Fotografie studovaných ploštic jsou uvedeny jako „supplementary data“ publikace IV. Barvy kutikul ploštic se mění během vývojového stádia jedince, ročního období, ale vliv na jejich zbarvení může mít i lokalita výskytu. Odstín zbarvení je pravděpodobně výsledkem přítomnosti určitých pterinů, ale i jejich vzájemného poměru.

4.1.3.3 Metody stanovení

Vzhledem k tomu, že řada pterinů slouží jako markery různých onemocnění, jsou pteriny stanovovány hlavně v moči, plazmě, séru a mozkomíšním moku [114]. Nejběžnější technikou používanou v analýze pterinů je HPLC s různými typy detekce (převážně fluorescenční a hmotnostní detekce) [133-136]. Převážná většina HPLC metod určených ke stanovení pterinů probíhala v reverzním módu HPLC (RP-HPLC). Kvůli vysoké polaritě pterinů a s ní spojené jejich nízké retenci v RP-HPLC byla v řadě publikací použita 100% vodná mobilní fáze. Z tohoto důvodu docházelo ke špatné opakovatelnosti analýz (jak z hlediska retenčních časů, tak i rozlišení) a byla zaznamenána i nižší životnost chromatografických kolon [5, 137, 138]. Jako vhodná alternativa k RP-HPLC pro analýzu polárních pterinů se jeví HILIC [5, 81, 139]. V roce 2010 Nováková a kol. studovali retenční a separační vlastnosti UHPLC hybridních

stacionárních fází na bázi BEH technologie určených pro HILIC v analýze vybraných pterinů (neopterin, biopterin, dihydroneopterin a dihydrobiopterin) [5]. V témže roce Shi a kol. úspěšně použili HILIC na aminopropylové stacionární fázi ve spojení s fluorescenčním detektorem k analýze neopterinu, biopterinu a isoxanthopterinu v moči [139]. K analýze pterinů byla použita i řada jiných instrumentálních technik než HPLC jako například kapilární elektroforéza [140-142] nebo různé spektroskopické metody např. povrchem zesílený Ramanův rozptyl [143] a synchronní fluorescenční spektrometrie [144]. Biopterin a neopterin v séru lze také stanovit metodou ELISA [145].

Pro analýzu derivátů pteridinu v kutikulách hmyzu byla použita hlavně papírová chromatografie, a/nebo tenkovrstvá chromatografie (TLC) [129, 146-151], popřípadě HPLC [152]. Nevýhodou TLC metody v analýze pterinů je její nízká selektivita pro různé deriváty. V roce 2003 Němec a kol. předpověděli, že analýza kutikul hmyzu z pohledu vyskytujících se derivátů pteridinu je mnohem komplexnějším problémem, než bylo do té doby publikováno [129]. Němec také vyjádřil názor, že k analýze pterinů v kutikulách hmyzu by byla vhodná citlivější a selektivnější analytická metoda jako například HPLC v kombinaci s MS detekcí [129]. Aplikace takového přístupu, tedy HPLC-MS/MS, byla použita v rámci této dizertační práce v analýze pterinů obsažených v ploštících *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* [81]. V aktuálních studiích, zabývajících se aposematickým zbarvením různých druhů hmyzu, byla k analýze derivátů pteridinu využita metoda kapilární elektroforézy [153, 154].

4.2 Výsledky a diskuse – komentáře k publikacím

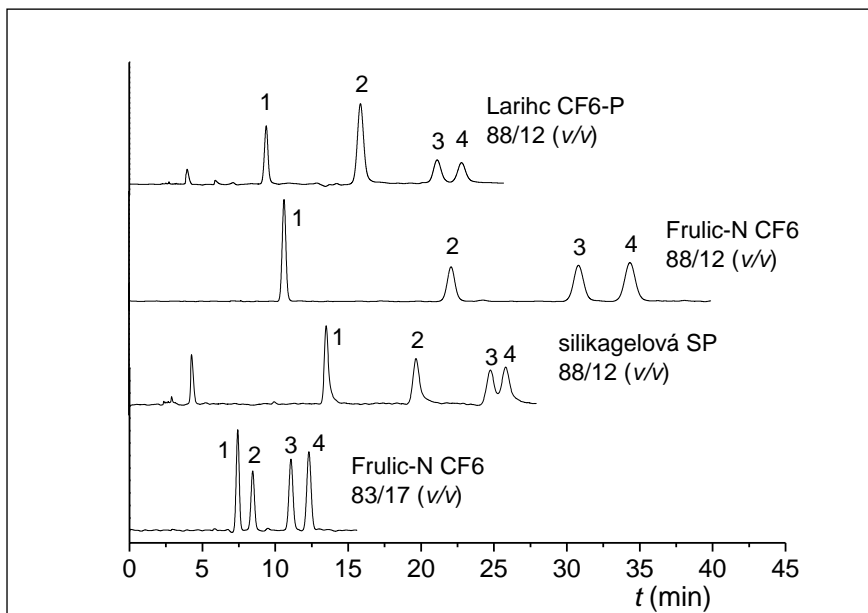
4.2.1 Porovnání vlastností silikagelové stacionární fáze a cyklofruktanových stacionárních fází v HILIC – Publikace II

Klasické silikagelové stacionární fáze patří mezi běžně používané stacionární fáze v HILIC. Modifikace těchto silikagelových stacionárních fází navázáním řady různých ligandů může zásadně změnit jejich separační účinky. Tato část dizertační práce je zaměřena na porovnání separačních vlastností třech stacionárních fází v HILIC. Byly porovnávány tyto chromatografické kolony:

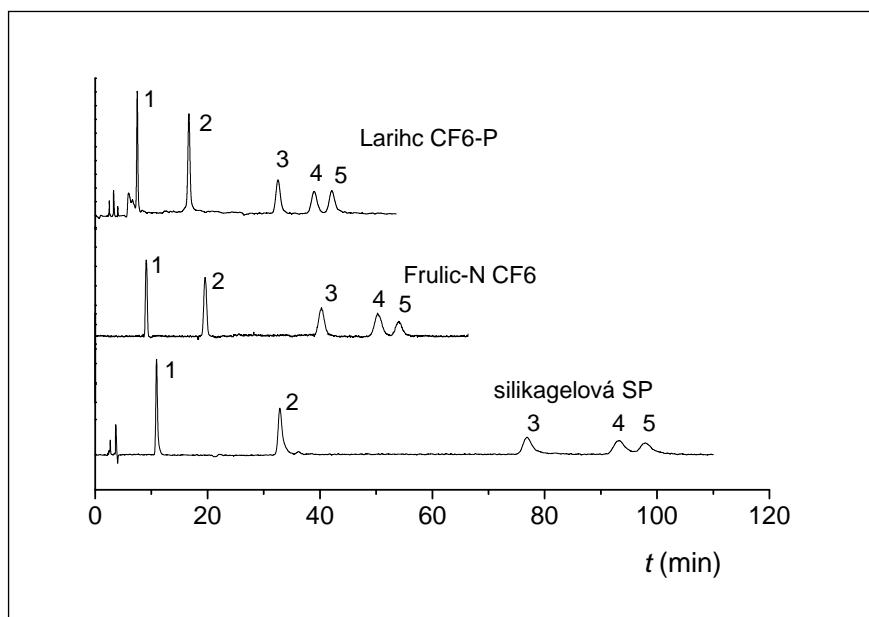
- Kolona Larihc CF6-P; stacionární fáze - isopropylovaný cyklofruktan 6 vázaný na silikagelovém nosiči, velikost částic 5 μm , kolona o rozměrech 250 mm \times 4,6 mm (AZYP, Arlington, USA)
- Kolona Frulic-N CF6; stacionární fáze – nativní cyklofruktan 6 vázaný na silikagelovém nosiči, velikost částic 5 μm , kolona o rozměrech 250 mm \times 4,6 mm (AZYP, Arlington, USA)
- Kolona se silikagelovou stacionární fází - obsahující stejný silikagel, který byl použit při přípravě kolon Larihc CF6-P a Frulic-N CF6, velikost částic 5 μm , kolona o rozměrech 250 mm \times 4,6 mm (Oddělení chemie a biochemie, Texaská univerzita v Arlingtonu, Arlington, USA).

K porovnání a charakterizaci kolon byly použity empirické testy navržené Schoenmakerem [155], Snyderem a Soczewinským [156] sloužící k odhalení, zda se na retenčním mechanismu podílí rozdělování a/nebo adsorpce. K porovnání hydrofobicity a silanolové aktivity testovaných stacionárních fází byl použit Waltersův test. K určení molekulárních interakcí podílejících se na retenci a separaci v daných separačních systémech byla použita LFER metoda. K porovnání selektivity a separační účinnosti výše zmíněných kolon byla optimalizována metoda pro separaci směsi čtyř pentapeptidů a pěti nonapeptidů.

Optimální složení mobilní fáze pro separaci pentapeptidů na koloně Larihc CF6-P bylo následující: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 88/12 (v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min a teplota kolony 25 °C. Při tomto složení mobilní fáze došlo k dostatečné separaci všech studovaných pentapeptidů, dobré symetrii píků a doba analýzy nepřesáhla 25 minut. Rozlišení všech píků pentapeptidů na základní linii při době analýzy nepřesahující 13 minut bylo dosaženo na koloně Frulic-N CF6 při složení mobilní fáze acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 83/17 (v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min a teplota kolony 25 °C. Silikagelová stacionární fáze (SP) neposkytovala při žádném testovaném složení mobilní fáze dostatečné rozlišení pro leucin enkefalin a [Met⁵]enkefalin a současně všechny píky vykazovaly chvostování. Při změně poměru organické a vodné složky mobilní fáze ve prospěch acetonitrilu došlo k prodloužení retence všech sledovaných pentapeptidů, ale vliv na rozlišení mezi leucin enkefalinem a [Met⁵]enkefalinem byl nepatrný. Optimální složení mobilní fáze pro separaci nonapeptidů na všech třech testovaných chromatografických kolonách bylo následující: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 80/20 (v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min. Nejrychlejší separace bylo dosaženo na koloně Larihc CF6-P. Na cyklofruktanových stacionárních fázích vykazovaly nonapeptidy symetrické píky a došlo k jejich vzájemnému rozdělení až na základní linii. V případě použití silikagelové stacionární fáze se doba analýzy blížila ke 100 minutám a všechny píky silně chvostovaly. Pro ilustraci jsou na obrázku 4.7 uvedeny chromatogramy separace pentapeptidů za optimalizovaných separačních podmínek a nonapeptidů na obrázku 4.8.



Obrázek 4.7 Chromatogram separace směsi pentapeptidů na třech testovaných chromatografických kolonách. Složení mobilní fáze: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00; poměr organické a vodné fáze je uveden pod názvem kolony v chromatogramu; průtok 1 ml/min; teplota kolony 25 °C; UV detekce při 220 nm; eluční pořadí analytů: 1, leucin enkefalin amid 2, [D-Ala²]leucin enkefalin 3, leucin enkefalin 4, [Met³]enkefalin.



Obrázek 4.8 Chromatogram separace směsi nonapeptidů na třech testovaných chromatografických kolonách. Složení mobilní fáze: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 80/20 (v/v); průtok 1 ml/min; teplota kolony 25 °C; UV detekce při 220 nm; eluční pořadí analytů: 1, oxytocin 2, [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresin 3, [Arg⁸]vasopresin 4, [Arg⁸]vasotocin 5, [Lys⁸]vasopresin.

Na základě empirických testů navržených Schoenmakerem [155] a Snyderem a Soczewinskim [156] bylo zjištěno, že se na retenčním mechanismu separace pentapeptidů a nonapeptidů podílí jak rozdělování, tak adsorpce, tudíž retence je určována kombinací obou procesů.

Z Waltersova testu je patrné, že indexy hydrofobicity (HI) jsou velmi nízké pro všechny testované stacionární fáze, což je ve shodě s polárním charakterem testovaných kolon. Nejnižší hodnota HI byla získána pro nederivatizovaný cyklofruktan (Frulic-N CF6), neboť tato stacionární fáze má z testovaných kolon nejvíce polární charakter, vzhledem k velkému množství přítomných polárních hydroxylových skupin. Díky derivatizaci hydroxylových skupin isopropylem se sníží polarita stacionární fáze (Larihc CF6-P), což se projeví vzrůstem hodnoty HI. Silanolový index (SI) poskytuje informaci o interakci analytů s volnými silanolovými skupinami. Hodnoty SI jsou pro všechny tři testované kolony srovnatelné a oproti kolonám používaným v RP-HPLC relativně vysoké. Modifikace silikagelové stacionární fáze cyklofruktany nemá významný vliv na hodnoty SI.

Molekulární interakce uplatňující se v daných separačních systémech byly porovnány metodou LFER ve třech mobilních fázích o složení acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00 v různých objemových poměrech: 88/12, 83/17, 80/20 (v/v). Regresní koeficienty byly získány multidimenzionální lineární regresní analýzou retenčních dat sady čtyřiceti testovacích analytů. Korelace experimentálně získaného $\log k$ a předpovězeného $\log k$ podle LFER modelu poskytuje korelační koeficienty vyšší než 0,97 pro cyklofruktanové stacionární fáze. Pro silikagelovou SP se korelační koeficienty pohybovaly od 0,91 do 0,93.

Regresní koeficient e byl statisticky významný pouze u chromatografické kolony Frulic-N CF6 při složení mobilní fáze acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 80/20 (v/v). Jeho negativní hodnota znamená, že analyty, které mají schopnost interagovat pomocí n- a π -elektronů, budou přednostně interagovat s mobilní fází, což povede ke snížení jejich retence.

Regresní koeficient s (udává rozdíl v dipolaritě/polarizibilitě) byl statisticky nevýznamný u silikagelové SP při všech testovaných mobilních fázích, což znamená, že daný typ interakce, který představuje regresní koeficient s , je shodný v mobilní i stacionární fázi, a proto se významně nepodílí na retenci. Regresní koeficient s byl

pozitivní a statisticky významný pro cyklofruktanové stacionární fáze. Je vidět, že s nárůstem obsahu pufru v mobilní fázi roste i regresní koeficient s , což může souviset se sorpcí složek mobilní fáze na povrchu stacionární fáze. Vyšších hodnot regresního koeficientu s bylo dosaženo pro kolonu Frulic-N CF6 v porovnání s kolonou Larihc CF6-P. Derivatizace hydroxylových skupin nativního cyklofruktanu isopropylem snižuje schopnost dipolarity/polarizibility.

Nejvyšší kladné hodnoty pro všechny stacionární fáze dosáhl regresní koeficient b . Z toho vyplývá, že všechny stacionární fáze mají silnou schopnost působit jako donor vodíku pro vodíkovou vazbu. Regresní koeficient b nabýval nejnížší hodnoty pro silikagelovou SP a při změně mobilní fáze se jeho hodnota neměnila. Nativní cyklofruktan obsahuje nejvíce skupin schopných podílet se na daném typu interakce, derivatizace isopropylem snižuje počet těchto interakčních míst, což se projeví snížením koeficientu b .

Regresní koeficient v , který charakterizuje disperzní interakce, byl statisticky nevýznamný u silikagelové SP. U cyklofruktanových stacionárních fází nabýval koeficient v negativní hodnoty pro všechny testované mobilní fáze. Změna disperzních interakcí, v RP-HPLC nazývána hydrofobicita, je ve shodě s výsledky získanými Waltersovým testem, kdy nejnížší hydrofobicity bylo dosaženo pro Frulic-N CF6 kolonu. Se zvyšujícím se obsahem vodné složky v mobilní fázi se zvyšuje záporná hodnota koeficientu v .

Regresní koeficient a byl statisticky nevýznamný pro všechny testované separační systémy.

Na základě provedených testů byl prokázán multimodální retenční mechanismus na všech testovaných kolonách. Bylo ukázáno, že modifikace silikagelové stacionární fáze cyklofruktany přináší další interakční možnosti, zvyšuje separační účinnost a selektivitu v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii.

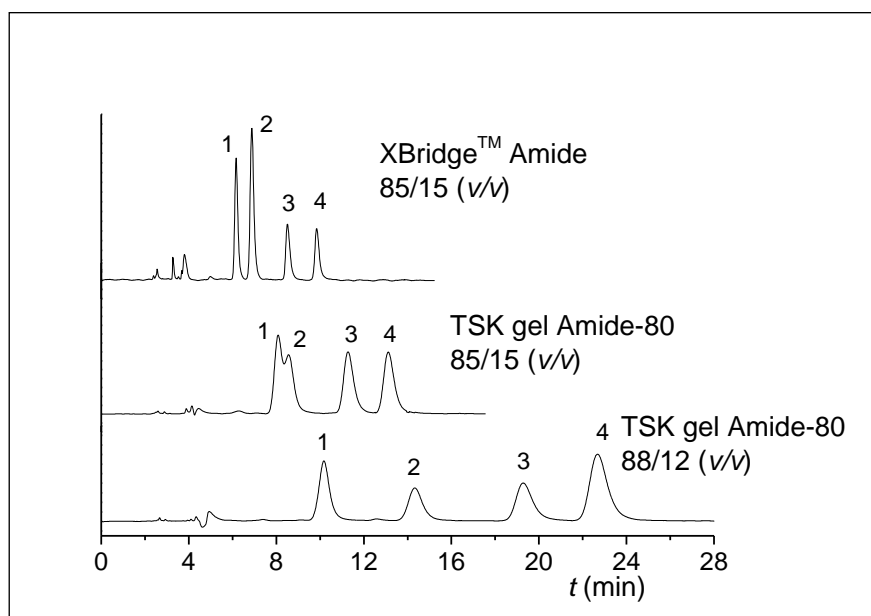
4.2.2 Porovnání vlastností dvou amidových stacionárních fázi v HILIC – Publikace III

Velmi často používané fáze v HILIC systémech jsou amidové stacionární fáze. Vzhledem k tomu, že se obecně vlastnosti „stejných“ chromatografických kolon od různých výrobců mohou lišit, byly charakterizovány a porovnány dvě amidové fáze. Konkrétně byly studovány tyto chromatografické kolony:

- Kolona XBridgeTM Amide o rozměrech 250 mm × 4,6 mm, s velikostí částic 3,5 µm a velikostí pórů 130 nm (Waters, Milford, USA)
- Kolona TSK gel Amide-80 o rozměrech 250 mm × 4,6 mm, s velikostí částic 5 µm a velikostí pórů 80 nm (Tosoh, Tokyo, Japonsko).

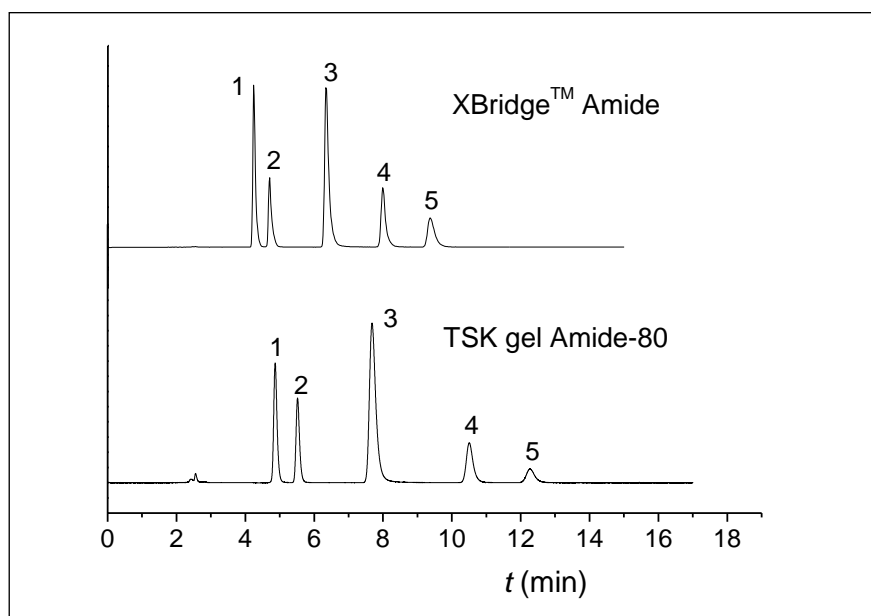
I když obě kolony obsahují shodný ligand, mohou, díky různým technologiím přípravy, poskytovat různé retenční vlastnosti a různou selektivitu. Ke komplexní charakterizaci studovaných separačních systémů byla použita řada testů. K porovnání separační účinnosti byly vybrány modelové látky zastupující biologicky zajímavé malé molekuly, a to vybrané pentapeptidy a nukleobáze. Pro porovnání a charakterizaci obou kolon byla dále použita metoda LFER, testy selektivity pro různé funkční skupiny, test bazických látek a vliv teploty na separaci.

Optimální složení mobilní fáze pro separaci směsi pentapeptidů na koloně XBridgeTM Amide bylo acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 85/15 (v/v). Při tomto složení mobilní fáze došlo k separaci všech studovaných analytů až na základní linii, doba analýzy nepřesáhla 10 minut. Při separaci pentapeptidů na koloně TSK gel Amide-80 za použití stejné mobilní fáze došlo ke koeluci leucin enkefalinu a [D-Ala³]leucin enkefalinu. Rozlišení všech studovaných pentapeptidů na druhé koloně bylo dosaženo při složení mobilní fáze acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 88/12 (v/v). Kolona XBridgeTM Amide poskytuje vyšší separační účinnost, ke které výrazně přispívá menší zrněné stacionární fáze (3,5 µm) oproti koloně TSK gel Amide-80 (5 µm). Chromatogramy pro porovnání separace směsi pentapeptidů jsou uvedeny na obrázku 4.9.



Obrázek 4.9 Chromatogramy separace směsi pentapeptidů na koloně XBridge™ Amide a TSK gel Amide-80. Složení mobilní fáze: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00; poměr organické a vodné fáze je uveden pod názvem kolony; průtok 1 ml/min; teplota kolony 25 °C; UV detekce při 220 nm; eluční pořadí analytů: 1, leucin enkefalin amid 2, [D-Ala²]leucin enkefalin 3, leucin enkefalin 4, [Met⁵]enkefalin.

Druhou skupinou látek, strukturně odlišných od pentapeptidů, separovaných na amidových kolonách byly nukleobáze (thymin, uracil, adenin, cytosin, guanin). Optimální složení mobilní fáze pro separaci nukleobází bylo shodné pro obě testované kolony: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 85/15 (v/v). Při tomto složení mobilní fáze došlo k separaci všech testovaných nukleobází až na základní linii na obou stacionárních fázích. Kolona XBridge™ Amide však poskytovala vyšší účinnost vzhledem k menší velikosti částic. Chromatogramy separace nukleobází jsou uvedeny na obrázku 4.10.



Obrázek 4.10 Chromatogramy separace nukleobází na kolonách XBridge™ Amide a TSK gel Amide-80. Složení mobilní fáze: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 85/15 (v/v); průtok 1 ml/min; teplota kolony 25 °C; UV detekce při 220 nm; eluční pořadí analytů: 1, thymin 2, uracil 3, adenin 4, cytosin 5, guanin.

Na základě vyhodnocení závislostí mezi retencí a eluční silou mobilní fáze navržených Schoenmakerem [155] a Snyderem a Soczewinskím [156] bylo zjištěno, že retenční mechanismus separace pentapeptidů, nonapeptidů a nukleobází je multimodální proces, na kterém se podílí jak rozdělování, tak adsorpce.

K porovnání amidových kolon metodou LFER byla zvolena mobilní fáze acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 85/15 (v/v). Regresní koeficienty LFER rovnice byly získány proměřením sady 39 testovacích analytů. Korelační koeficient byl pro obě testované kolony vyšší než 0,96, což naznačuje velmi dobrou korelaci s experimentálními daty. Regresní koeficient v je záporný a srovnatelný pro obě testované stacionární fáze, proto se hydrofóbnější látky budou za daných separačních podmínek méně zadržovat. Regresní koeficienty e a s jsou statisticky nevýznamné, což znamená, že se jimi popsané interakce za daných separačních podmínek nepodílejí na retenci. Regresní koeficienty a a b , které vyjadřují schopnost interagovat pomocí vodíkových vazeb, nabývají statisticky významných pozitivních hodnot u obou kolon.

Podle LFER modelu vykazuje kolona TSK gel Amide-80 vyšší hodnoty regresních koeficientů a a b , což odpovídá vyšší schopnosti interagovat pomocí vodíkových interakcí.

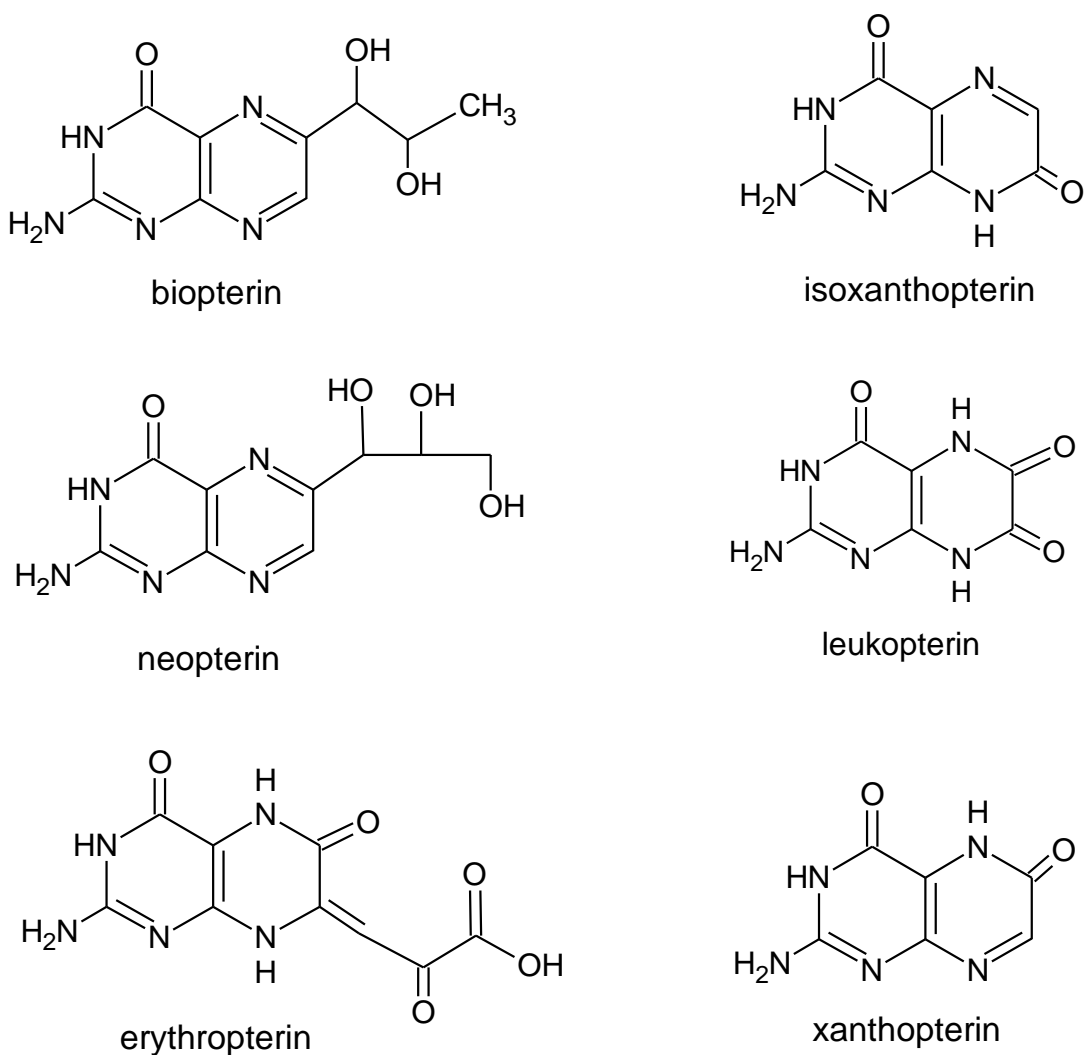
Z výsledků testů selektivity pro hydroxylovou skupinu vyplývá, že obě separační kolony poskytují shodnou selektivitu pro hydroxylovou skupinu. Větší selektivita pro aminoskupinu byla prokázána na koloně TSK gel Amide-80, což je ve shodě s LFER výsledky (vyšší hodnota regresního koeficientu b), neboť aminoskupiny mohou interagovat pomocí vodíkových interakcí.

Iontové interakce byly testovány pomocí vybraných bazických látek. Při složení mobilní fáze acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 85/15 (v/v) poskytovala kolona TSK gel Amide-80 větší možnosti uplatnění iontově-výměnné (kation-výměnné) interakce oproti koloně XBridgeTM Amide.

Je známo, že teplota kolony může mít vliv na retenci a selektivitu separačního procesu. Na základě studia vlivu teploty na retenci vybraných analytů nebyl zaznamenán zásadní rozdíl mezi testovanými kolonami. U testovaných analytů docházelo ke snižování retence se zvyšující se teplotou na koloně. Se změnou teploty nedocházelo ke změně retenčního mechanismu.

4.2.3 Analýza pterinů v ploštících *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* pomocí HILIC-MS/MS – Publikace IV

Aplikační možnosti separačního systému HILIC v kombinaci s vhodnou detekcí ukazuje publikace IV. Cílem bylo nalézt vhodnou LC metodu k identifikaci a ke stanovení šesti pterinů, jmenovitě biopterinu, isoxanthopterinu, xanthopterinu, leukopterinu, neopterinu a erythropterinu, jejichž struktury jsou uvedeny na obrázku 4.11, v různých formách ploštic *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum*.



Obrázek 4.11 Struktura studovaných pterinů.

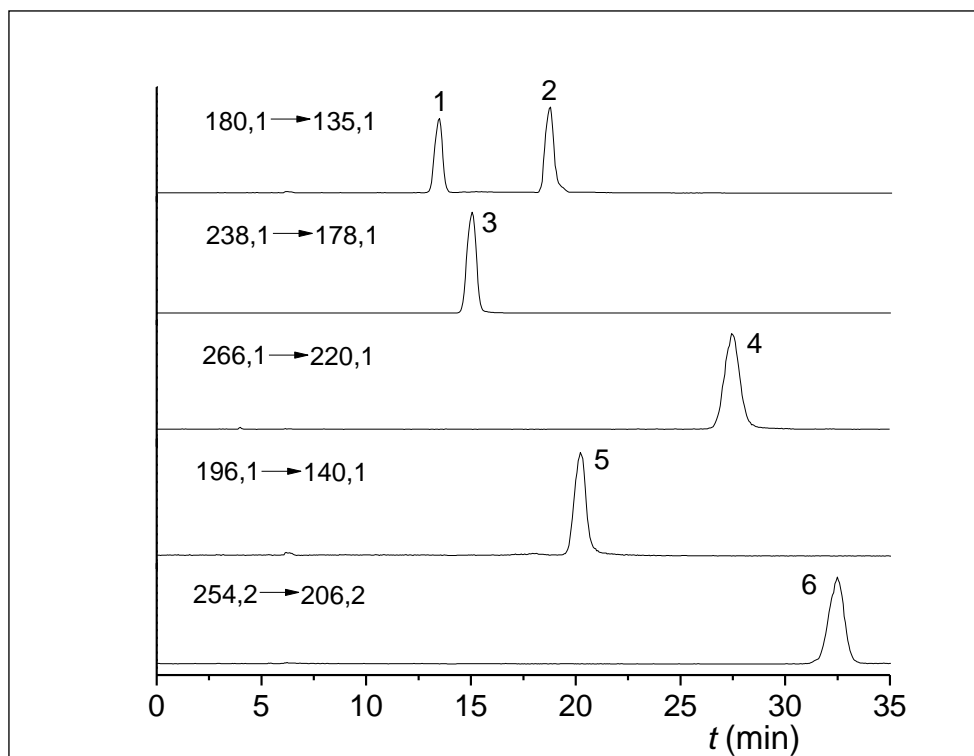
Vzhledem k vysoké polaritě studovaných analytů byla k separaci zvolena hydrofilní interakční kapalinová chromatografie. Byly testovány dvě komerčně dostupné chromatografické kolony určené pro HILIC:

- Atlantis HILIC Silica o rozměrech 150 mm × 4,6 mm, s velikostí částic 3 µm (Waters, Milford, USA)
- ZIC-HILIC o rozměrech 150 mm × 4,6 mm, s velikostí částic 3,5 µm (Merck, Darmstadt, Německo).

K detekci byla zvolena tandemová hmotnostní spektrometrie (trojitý kvadrupól). Podle literatury nebyl takový přístup v analýze pterinů v kutikulách hmyzu doposud použit.

Bylo optimalizováno nastavení hmotnostního spektrometru. Měření byla prováděna v MRM módu, proto byly nejdříve nalezeny vhodné prekurzorové a produktové ionty studovaných analytů. Bylo optimalizováno nastavení parametrů elektrospreje s „Jet stream“ technologií v závislosti na složení a průtoku mobilní fáze.

Největší vliv na retenci a separaci studovaných pterinů na obou kolonách měla změna poměru organické a vodné složky v mobilní fázi. Na základě optimalizace separace studovaných pterinů s ohledem na tandemovou hmotnostní detekci byl zvolen separační systém skládající se z kolony ZIC-HILIC a mobilní fáze acetonitril/5 mM octan amonný, pH = 6,80, 85/15 (v/v), průtok mobilní fáze 0,5 ml/min a teplota kolony 30 °C. Výsledky analýzy standardů studovaných pterinů za optimálních LC a MS podmínek ukazuje obrázek 4.12.



Obrázek 4.12 Chromatogramy separace standardů pterinů o koncentraci = 625 ng/ml na koloně ZIC-HILIC. Složení mobilní fáze: acetonitril/5 mM octan amonný, pH = 6,80, 85/15 (v/v); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; MS/MS detekce v MRM módu; označení analytů: 1, isoxanthopterin 2, xanthopterin 3, biopterin 4, erythropterin 5, leukopterin 6, neopterin.

Kvantifikace byla prováděna na základě kalibrační přímky sestavené pomocí vážené lineární regrese ($1/x^2$) závislosti velikosti ploch píků na koncentraci analytů. Limity detekce se pohybovaly od 0,1 ng/ml pro biopterin až po 6,2 ng/ml pro erythropterin. Matriční efekty byly vyhodnoceny na základě srovnání výsledků obsahu pterinů v červené formě *Graphosoma lineatum* získaných metodou kalibrační křivky a metodou standardního přídatku. Při analýze pterinů v kutikule *Graphosoma lineatum* nedocházelo k ovlivnění ionizace matričními efekty. Dále byla ověřována selektivita, přenos vzorku, denní a mezidenní přesnost a správnost. Přesnost měření dané metody se pohybovala od 0,79 % do 8,09 % a správnost měření se pohybovala od 1,85 % do 9,63 %.

Nově vyvinutá a validovaná metoda HILIC-MS/MS byla použita ke stanovení vybraných pterinů ve čtyřech formách *Graphosoma lineatum* (larvální, světlá, žlutá a červená) a jedné formě *Graphosoma semipunctatum* (oranžová). Výsledky analýzy

obsahu pterinů jednotlivých forem *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1 Množství pterinů, vyjádřené jako množství analytu v µg na 1 mg integumentu, v různých formách *Graphosoma lineatum* (GL.) and *Graphosoma semipunctatum* (GS.); relativní standardní odchylka je uvedena v závorce

Analyt	GL. červená forma	GS. oranžová forma	GL. žlutá forma	GL. světlá forma	GL. larvální forma
biopterin	0,77 (5,19)	5,24 (6,53)	1,18 (4,82)	-	0,14 (7,22)
neopterin	-	-	3,98 (3,14)	-	-
xanthopterin	-	-	-	-	-
isoxanthopterin	12,01 (11,23)	211,88 (13,21)	30,34 (8,09)	11,03 (11,28)	2,63 (9,02)
erythropterin	190,76 (9,65)	29,43 (6,86)	136,05 (8,33)	16,44 (4,99)	-
leukopterin	119,67 (12,11)	127,60 (10,76)	51,16 (7,38)	256,17 (5,92)	-

Z tabulky 4.1 je vidět, že xanthopterin nebyl nalezen v žádné analyzované formě. Neopterin se vyskytoval pouze u žluté formy. Isoxanthopterin se vyskytoval ve všech studovaných formách v různém množství. Larvální forma obsahovala pouze isoxanthopterin a malé množství biopterinu. Z uvedených výsledků je vidět, že jednotlivé formy *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* mají rozdílné obsahy studovaných pterinů, což ovlivňuje zabarvení ploštic.

4.3 Literatura II

- [1] Hemstrom, P., Irgum, K.: J. Sep. Sci. 29 (2006) 1784-1821.
- [2] Alpert, A. J.: J. Chromatogr. 499 (1990) 177-196.
- [3] Linden, J. C., Lawhead, C. L.: J. Chromatogr. 105 (1975) 125-133.
- [4] Buszewski, B., Noga, S.: Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 231-247.
- [5] Novakova, L., Kaufmannova, I., Janska, R.: J. Sep. Sci. 33 (2010) 765-772.
- [6] Bernal, J., Ares, A. M., Pol, J., Wiedmer, S. K.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 7438-7452.
- [7] Li, R. P., Guo, Y. L., Yuan, Q.: J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 34 (2011) 1112-1132.
- [8] Ares, A. M., Bernal, J.: Cent. Eur. J. Chem. 10 (2012) 534-553.
- [9] Gama, M. R., Silva, R. G. D., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G.: Trends Anal. Chem. 37 (2012) 48-60.
- [10] Berthod, A., Chang, S. S. C., Kullman, J. P. S., Armstrong, D. W.: Talanta 47 (1998) 1001-1012.
- [11] Gritti, F., Guiochon, G.: J. Chromatogr. A 1099 (2005) 1-42.
- [12] Guo, Y., Gaiki, S.: J. Chromatogr. A 1074 (2005) 71-80.
- [13] Hao, Z., Xiao, B., Weng, N.: J. Sep. Sci. 31 (2008) 1449-1464.
- [14] Chirita, R. I., West, C., Zubrzycki, S., Finaru, A. L., Elfakir, C.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5939-5963.
- [15] Jandera, P.: Anal. Chim. Acta 692 (2011) 1-25.
- [16] McCalley, D. V.: J. Chromatogr. A 1171 (2007) 46-55.
- [17] McCalley, D. V., Neue, U. D.: J. Chromatogr. A 1192 (2008) 225-229.
- [18] Yoshida, T.: J. Biochem. Biophys. Methods 60 (2004) 265-280.
- [19] Boumahraz, M., Davydov, V. Y., Kiselev, A. V.: Chromatographia 15 (1982) 751-756.
- [20] Majors, R. E.: J. Chromatogr. Sci. 18 (1980) 488-511.
- [21] Orth, P., Engelhardt, H.: Chromatographia 15 (1982) 91-96.
- [22] Verhaar, L. A. T., Kuster, B. F. M.: J. Chromatogr. 234 (1982) 57-64.
- [23] Nikolov, Z. L., Reilly, P. J.: J. Chromatogr. 325 (1985) 287-293.

- [24] Kalikova, K., Kozlik, P., Gilar, M., Tesarova, E.: J. Sep. Sci. 36 (2013) 2421-2429.
- [25] Karatapanis, A. E., Fiamegos, Y. C., Stalikas, C. D.: Chromatographia 71 (2010) 751-759.
- [26] Kozlik, P., Simova, V., Kalikova, K., Bosakova, Z., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65.
- [27] Padivitage, N. L. T., Armstrong, D. W.: J. Sep. Sci. 34 (2011) 1636-1647.
- [28] Jandera, P., Hajek, T.: J. Sep. Sci. 32 (2009) 3603-3619.
- [29] Guo, Y., Gaiki, S.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5920-5938.
- [30] Chauve, B., Guillarme, D., Cleon, P., Veuthey, J.L.: J. Sep. Sci. 33 (2010) 752-764.
- [31] Kirkland, J. J., Dilks, C. H., Destefano, J. J.: J. Chromatogr. 635 (1993) 19-30.
- [32] Li, R. P., Huang, J. X.: J. Chromatogr. A 1041 (2004) 163-169.
- [33] Strege, M. A.: Anal. Chem. 70 (1998) 2439-2445.
- [34] Huang, H. X., Guo, H. Y., Xue, M. Y., Liu, Y. J., Yang, J. J., Liang, X. M., Chu, C. H.: Talanta 85 (2011) 1642-1647.
- [35] Jia, S., Park, J. H., Lee, J., Kwon, S. W.: Talanta 85 (2011) 2301-2306.
- [36] Kovarikova, P., Stariat, J., Klimes, J., Hruskova, K., Vavrova, K.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 416-426.
- [37] Liu, Q. X., Xu, L. Y., Ke, Y. X., Jin, Y., Zhang, F. F., Liang, X. M.: J. Pharm. Biomed. Anal. 54 (2011) 623-628.
- [38] Gezici, O., Kara, H.: Talanta 85 (2011) 1472-1482.
- [39] Kobe, R., Ishihara, Y., Takano, J., Kitami, H.: Bunseki Kagaku 60 (2011) 859-863.
- [40] Schuster, G., Lindner, W.: Anal. Bioanal. Chem. 400 (2011) 2539-2554.
- [41] Singer, D., Kuhlmann, J., Muschket, M., Hoffmann, R.: Anal. Chem. 82 (2010) 6409-6414.
- [42] Gilar, M., Jaworski, A.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 8890-8896.
- [43] Gilar, M., Yu, Y. Q., Ahn, J., Xie, H. W., Han, H. H., Ying, W. T., Qian, X. H.: Anal. Biochem. 417 (2011) 80-88.
- [44] Chen, P., Li, W., Li, Q., Wang, Y. H., Li, Z. G., Ni, Y. F., Koike, K.: Talanta 85 (2011) 1634-1641.
- [45] Gupta, P. K., Brown, J., Biju, P. G., Thaden, J., Deutz, N. E., Kumar, S., Hauer-Jensen, M., Hendrickson, H. P.: Anal. Methods 3 (2011) 1759-1768.

- [46] Karatapanis, A. E., Fiamegos, Y. C., Stalikas, C. D.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2871-2879.
- [47] Feng, J. T., Guo, Z. M., Shi, H., Gu, J. P., Jin, Y., Liang, X. M.: Talanta 81 (2010) 1870-1876.
- [48] Pack, B. W., Risley, D. S.: J. Chromatogr. A 1073 (2005) 269-275.
- [49] Dejaegher, B., Heyden, Y. V.: J. Sep. Sci. 33 (2010) 698-715.
- [50] Jandera, P.: J. Sep. Sci. 31 (2008) 1421-1437.
- [51] Qiu, H. X., Loukotkova, L., Sun, P., Tesarova, E., Bosakova, Z., Armstrong, D. W.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 270-279.
- [52] Kawamura, M., Uchiyama, T., Kuramoto, T., Tamura, Y., Mizutani, K.: Carbohydr. Res. 192 (1989) 83-90.
- [53] Sun, P., Wang, C. L., Breitbach, Z. S., Zhang, Y., Armstrong, D. W.: Anal. Chem. 81 (2009) 10215-10226.
- [54] Janeckova, L., Kalikova, K., Vozka, J., Armstrong, D. W., Bosakova, Z., Tesarova, E.: J. Sep. Sci. 34 (2011) 2639-2644.
- [55] Kalikova, K., Janeckova, L., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1393-1398.
- [56] Sun, P., Wang, C. L., Padivitage, N. L. T., Nanayakkara, Y. S., Perera, S., Qiu, H. X., Zhang, Y., Armstrong, D. W.: Analyst 136 (2011) 787-800.
- [57] Vozka, J., Kalikova, K., Janeckova, L., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: Anal. Lett. 45 (2012) 2344-2358.
- [58] Gondova, T., Petrovaj, J., Kutschy, P., Armstrong, D. W.: J. Chromatogr. A 1272 (2013) 100-105.
- [59] Perera, S., Na, Y. C., Doundoulakis, T., Ngo, V. J., Feng, Q., Breitbach, Z. S., Lovely, C. J., Armstrong, D. W.: Chirality 25 (2013) 133-140.
- [60] Zhang, Y. J., Huang, M. X., Zhang, Y. P., Armstrong, D. W., Breitbach, Z. S., Ryoo, J. J.: Chirality 25 (2013) 735-742.
- [61] Yoshida, T.: Anal. Chem. 69 (1997) 3038-3043.
- [62] Karlsson, G., Winge, S., Sandberg, H.: J. Chromatogr. A 1092 (2005) 246-249.
- [63] Propagační materiál Tosoh Bioscience: *TSKgel Amide-80 Columns for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*; dostupné na URL:

<http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/2FABDA77-D538-4AA4-AD22-451871C64870/0/B07L03A_TSKgelAmide80_HILIC_brochure.pdf>
[cit. 15.4.2014].

[64] Propagační materiál Waters: *A Review of Waters Hybrid Particle Technology*; dostupné naURL:

<<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001159en.pdf>>
[cit.15.4.2014].

[65] Olsovska, J., Jurkova, M.: Kvasny Prum. 58 (2012) 30-35.

[66] Ivesic, M., Babic, S., Krivohlavek, A., Smit, Z.: Anal. Methods 5 (2013) 5188-5194.

[67] Kokotou, M. G., Thomaidis, N. S.: Chromatographia 75 (2012) 457-467.

[68] Zhao, H. Q., Wang, X., Li, H. M., Yang, B., Yang, H. J., Huang, L. Q.: Molecules 18 (2013) 9755-9769.

[69] Propagační materiál Waters: *XBridge Amide Column*; dostupné naURL:
<<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003232en.pdf>>
[cit.15.4.2014].

[70] Jiang, W., Irgum, K.: Anal. Chem. 71 (1999) 333-344.

[71] Viklund, C., Irgum, K.: Macromolecules 33 (2000) 2539-2544.

[72] Jiang, W., Irgum, K.: Anal. Chem. 74 (2002) 4682-4687.

[73] Wikberg, E., Verhage, J. J., Viklund, C., Irgum, K.: J. Sep. Sci. 32 (2009) 2008-2016.

[74] Propagační materiál Merck: *A Practical Guide to HILIC*; dostupné naURL:
<http://www.sequant.com/files/documents/support/MerckSeQuant.ZIC-HILIC.Technical_Guide.A_Practical_Guide_to_HILIC.pdf>
[cit.15.4.2014].

[75] Arora, B., Narayanasamy, A., Nirmal, J., Halder, N., Patnaik, S., Ravi, A. K., Velpandian, T.: J. Chromatogr. B 944 (2014) 49-54.

[76] Sriboonvorakul, N., Leepipatpiboon, N., Dondorp, A. M., Pouplin, T., White, N. J., Tarning, J., Lindegardh, N.: J. Chromatogr. B 941 (2013) 116-122.

[77] Di Palma, S., Boersema, P. J., Heck, A. J. R., Mohammed, S.: Anal. Chem. 83 (2011) 3440-3447.

- [78] Neue, K., Mormann, M., Peter-Katalinic, J., Pohlentz, G.: *J. Proteome Res.* 10 (2011) 2248-2260.
- [79] Marrubini, G., Pedrali, A., Hemstrom, P., Jonsson, T., Appelblad, P., Massolini, G.: *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 3493-3502.
- [80] Sentkowska, A., Biesaga, M., Pyrzynska, K.: *Talanta* 115 (2013) 284-290.
- [81] Kozlik, P., Krajicek, J., Kalikova, K., Tesarova, E., Cabala, R., Exnerova, A., Stys, P., Bosakova, Z.: *J. Chromatogr. B* 930 (2013) 82-89.
- [82] Tan, L. C., Carr, P. W., Abraham, M. H.: *J. Chromatogr. A* 752 (1996) 1-18.
- [83] Kawachi, Y., Ikegami, T., Takubo, H., Ikegami, Y., Miyamoto, M., Tanaka, N.: *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5903-5919.
- [84] Schuster, G., Lindner, W.: *J. Chromatogr. A* 1301 (2013) 98-110.
- [85] Neue, V. D.: *HPLC columns, theory, technology and practice*, New York 1997.
- [86] Unger, K. K.: *Packings and stationary phases in chromatographic techniques*, New York 1990.
- [87] Schott, R. P. W.: *Silica Gel and Bonded Phases. Their Production, Properties and Use in LC*, New York 1993.
- [88] Claessens, H. A., van Straten, M. A., Cramers, C. A., Jezierska, M., Buszewski, B.: *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 135-156.
- [89] Euerby, M., Petersson, P.: *J. Chromatogr. A* 994 (2003) 13-36.
- [90] Cruz, E., Euerby, M. R., Johnson, C. M., Hackett, C. A.: *Chromatographia* 44 (1997) 151-161.
- [91] Cole, L. A., Dorsey, J. G.: *Anal. Chem.* 64 (1992) 1317-1323.
- [92] Cole, L. A., Dorsey, J. G., Dill, K. A.: *Anal. Chem.* 64 (1992) 1324-1327.
- [93] Kimata, K., Iwaguchi, K., Onishi, S., Jinno, K., Eksteen, R., Hosoya, K., Araki, M., Tanaka, N.: *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 721-728.
- [94] Engelhardt, H., Jungheim, M.: *Chromatographia* 29 (1990) 59-68.
- [95] Walters, M. J.: *J. AOAC Int.* 70 (1987) 465-469.
- [96] Nahum, A., Horvath, C.: *J. Chromatogr.* 203 (1981) 53-63.
- [97] Galushko, S. V.: *Chromatographia* 36 (1993) 39-42.
- [98] Vitha, M., Carr, P. W.: *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 143-194.
- [99] Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A.: *Chromatographia* 76 (2013) 211-226.
- [100] Fujita, T., Hansch, C., Iwasa, J.: *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 5175-5180.

- [101] Hansch, C., Fujita, T.: J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 1616-1626.
- [102] Poole, C. F., Poole, S. K.: J. Chromatogr. A 965 (2002) 263-299.
- [103] Sandi, A., Nagy, M., Szepeszy, L.: J. Chromatogr. A 893 (2000) 215-234.
- [104] Abraham, M. H., Whiting, G. S., Doherty, R. M., Shuely, W. J.: J. Chromatogr. 587 (1991) 213-228.
- [105] Abraham, M. H., Andonianhaftvan, J., Whiting, G. S., Leo, A., Taft, R. S.: Perkin Trans. 2 (1994) 1777-1791.
- [106] Abraham, M. H., McGowan, J. C.: Chromatographia 23 (1987) 243-246.
- [107] Abraham, M. H.: Chem. Soc. Rev. 22 (1993) 73-83.
- [108] Janeckova, L., Kalikova, K., Bosakova, Z., Tesarova, E.: J. Sep. Sci. 33 (2010) 3043-3051.
- [109] Kalikova, K., Lokajova, J., Tesarova, E.: J. Sep. Sci. 29 (2006) 1476-1485.
- [110] Quiming, N. S., Denola, N. L., Saito, Y., Catabay, A. P., Jinno, K.: Chromatographia 67 (2008) 507-515.
- [111] Quiming, N. S., Denola, N. L., Saito, Y., Jinno, K.: Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 1693-1706.
- [112] Jandera, P., Hajek, T., Skerikova, V., Soukup, J.: J. Sep. Sci. 33 (2010) 841-852.
- [113] Michel, M., Baczek, T., Studzinska, S., Bodzioch, K., Jonsson, T., Kaliszan, R., Buszewski, B.: J. Chromatogr. A 1175 (2007) 49-54.
- [114] Tomandl, J.: Chem. Listy 92 (1998) 689-697.
- [115] Bel, Y., Porcar, M., Socha, R., Nemec, V., Ferre, J.: Arch. Insect Biochem. Physiol. 34 (1997) 83-98.
- [116] Tomsikova, H., Tomsik, P., Solich, P., Novakova, L.: Bioanalysis 5 (2013) 2307-2326.
- [117] White, R. H.: Biochemistry 35 (1996) 3447-3456.
- [118] Armarego, W. L. F., Randles, D.: *Chemistry and Biochemistry of Pteridines*, New York 1983.
- [119] Soniat, M., Martin, C. B.: Pteridines 19 (2008) 120-124.
- [120] Albert, A., Brown, D. J., Cheeseman, G.: J. Chem. Soc. (1952) 4219-4232.
- [121] Schuttelkopf, A. W., Hardy, L. W., Beverley, S. M., Hunter, W. N.: J. Mol. Biol. 352 (2005) 105-116.

- [122] Takeda, T., Hamazaki, T., Wakahara, R., Fujioka, H., Niihira, S., Shintaku, H.: Pteridines 23 (2012) 104-109.
- [123] Rubenstein, M., Muchnik, S., Garber, S. L., Arruda, J. A. L., Dunea, G.: Int. J. Biochem. 25 (1993) 1873-1880.
- [124] Wood, J. M., Schallreuterwood, K. U., Lindsey, N. J., Callaghan, S., Gardner, M. L. G.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 206 (1995) 480-485.
- [125] Krut, J. J., Mellberg, T., Price, R. W., Hagberg, L., Fuchs, D., Rosengren, L., Nilsson, S., Zetterberg, H., Gisslen, M.: PLoS One 9 (2014) 1-7.
- [126] Price, R. W., Peterson, J., Fuchs, D., Angel, T. E., Zetterberg, H., Hagberg, L., Spudich, S., Smith, R. D., Jacobs, J. M., Brown, J. N., Gisslen, M.: J. Neuroimmune Pharmacol. 8 (2013) 1147-1158.
- [127] Weitgasser, R., Lechleitner, M., Koch, T., Galvan, G., Muhlmann, J., Steiner, K., Hoppichler, F.: Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 111 (2003) 127-131.
- [128] Copikova, J., Uher, M., Lapcik, O., Moravcova, J., Drasar, P.: Chem. Listy 99 (2005) 802-816.
- [129] Nemec, V., Breuer, M., De Loof, A.: Eur. J. Entomol. 100 (2003) 19-23.
- [130] Johansen, A. I., Exnerova, A., Svadova, K. H., Stys, P., Gamberale-Stille, G., Tullberg, B. S.: Ecol. Entomol. 35 (2010) 602-610.
- [131] Tullberg, B. S., Gamberale-Stille, G., Bohlin, T., Merilaita, S.: Behav. Ecol. Sociobiol. 62 (2008) 1389-1396.
- [132] Ruxton, G. D., Sherratt, T. N., Speed, M. P.: *Avoiding Attack: The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals and Mimicry*, Oxford University Press, New York 2004.
- [133] Canada-Canada, F., Espinosa-Mansilla, A., Munoz de la Pena, A., Mancha de Llanos, A.: Anal. Chim. Acta 648 (2009) 113-122.
- [134] Espinosa-Mansilla, A., Munoz de la Pena, A., Canada-Canada, F., Mancha de Llanos, A.: Talanta 77 (2008) 844-851.
- [135] Flavall, E. A., Crone, E. M., Moore, G. A., Gieseg, S. P.: J. Chromatogr. 863 (2008) 167-171.
- [136] Stea, B., Halpern, R. M., Halpern, B. C., Smith, R. A.: Clin. Chim. Acta 113 (1981) 231-242.
- [137] Majors, R. E.: LC GC N. Am. 24 (2006) 16-20.

- [138] Walter, T. H., Iraneta, P., Capparella, M.: *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 177-183.
- [139] Shi, Z.-G., Wu, Y.-B., Luo, Y.-B., Feng, Y.Q.: *Chromatographia* 71 (2010) 761-768.
- [140] Gamagedara, S., Gibbons, S., Ma, Y.: *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 120-128.
- [141] Gibbons, S. E., Stayton, I., Ma, Y.: *Electrophoresis* 30 (2009) 3591-3597.
- [142] Koslinski, P., Bujak, R., Daghir, E., Markuszewski, M. J.: *Electrophoresis* 32 (2011) 2044-2054.
- [143] Stevenson, R., Stokes, R. J., MacMillan, D., Armstrong, D., Faulds, K., Wadsworth, R., Kunuthur, S., Suckling, C. J., Graham, D.: *Analyst* 134 (2009) 1561-1564.
- [144] Wan, Y. Q., Tang, L. J., Tan, T.: *J. Fluoresc.* 20 (2010) 1191-1198.
- [145] Craig, D. G., Lee, P., Pryde, E. A., Hayes, P. C., Simpson, K. J.: *Aliment. Pharm. Therap.* 38 (2013) 1395-1404.
- [146] Melber, C., Schmidt, G. H.: *Comp. Bioch. Phys. B* 108 (1994) 79-94.
- [147] Merlini, L., Nasini, G.: *J. Insect Physiol.* 12 (1966) 123-127.
- [148] Niva, C. C., Takeda, M.: *Comp. Bioch. Phys. B* 132 (2002) 653-660.
- [149] Smith, R. L., Forrest, H. S.: *J. Insect Physiol.* 15 (1969) 953-957.
- [150] Socha, R., Nemec, V.: *Acta Entomol. Bohemos.* 89 (1992) 195-203.
- [151] Socha, R., Nemec, V.: *Eur. J. Entomol.* 93 (1996) 525-534.
- [152] Porcar, M., Bel, Y., Socha, R., Nemec, V., Ferre, J.: *J. Chromatogr. A* 724 (1996) 193-197.
- [153] Fabricant, S. A., Kemp, D. J., Krajicek, J., Bosakova, Z., Herberstein, M. E.: *PLoS One* 8 (2013) 1-8.
- [154] Krajicek, J., Kozlik, P., Exnerova, A., Stys, P., Bursova, M., Cabala, R., Bosakova, Z.: *J. Chromatogr. A* 1336 (2014) 94-100.
- [155] Schoenmakers, P. J., Billiet, H. A. H., Degalan, L.: *J. Chromatogr.* 218 (1981) 261-284.
- [156] Snyder, L. R., Poppe, H.: *J. Chromatogr.* 184 (1980) 363-413.

PUBLIKACE II

EFFECT OF SILICA GEL MODIFICATION WITH CYCLOFRUCTANS ON PROPERTIES OF HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY STATIONARY PHASES

Kozlík, P.; Šimová, V.; Kalíková, K.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.

J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65.



Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases[☆]

Petr Kozlák^a, Veronika Šímová^b, Květa Kalíková^{b,*}, Zuzana Bosáková^a, Daniel W. Armstrong^c, Eva Tesařová^b

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

^b Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

^c Department of Chemistry and Biochemistry, The University of Texas at Arlington, Arlington, TX 76019, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2012

Received in revised form 25 July 2012

Accepted 1 August 2012

Available online 13 August 2012

Keywords:

HILIC

Cyclofructan

Characterization of separation system

LFER

Peptides

ABSTRACT

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) offers very good possibilities for separation of polar compounds as an alternative to reversed phase HPLC where polar compounds are not sufficiently retained. HILIC is becoming more popular for the analysis of biologically interesting (active) analytes. Various stationary phases are commercially available however, development of new materials (sorbents) suitable for HILIC systems still continues. Silica gel columns can be used directly but their modification can improve separation ability of the stationary phases. Cyclofructan-based stationary phases are demonstrated as possible HILIC columns in this work. The effect of silica gel modification by cyclofructan and a derivatized cyclofructan was studied in detail. HILIC separation systems with silica gel, cyclofructan and isopropyl cyclofructan modified silica stationary phases were compared. The detailed study of chromatographic behavior of peptides revealed that multimodal retention mechanism is present in systems with these stationary phases. Mobile phase composition changes the types of interactions and their strengths. It appears that ability to donate protons and dispersion forces are the main interactions that affect retention in HILIC with cyclofructan-based columns while they are less important in separation systems with bare silica stationary phase. Suitability of cyclofructan-based stationary phases in HILIC for separation of pentapeptides and nonapeptides was demonstrated.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is a technique that has attracted increasing attention since it offers an alternative approach for separation of highly polar compounds. The interest in the HILIC technique in the last years has been promoted by growing demand for the analysis of polar drugs, metabolites and biologically important compounds in proteomics, glycomics and clinical analysis [1,2]. The number of publications focused on HILIC has increased substantially since 2003 [3]. Alpert [4] first coined the name HILIC in 1990 for the chromatographic technique where the analytes interact with hydrophilic stationary phase (SP) and the elution is generated by relatively hydrophobic binary mobile phase containing water as a strong eluting solvent. Of course this

chromatographic technique has been used for years previously under a variety of different names [5]. The primary retention mechanism in HILIC was believed to be analyte partitioning between the bulk eluent and the water-rich layer that is partially immobilized on the surface of the stationary phase [4]. However, it is now known that this is not adequate to explain retention in HILIC [5]. The predominant retention mechanism in HILIC separation is not unequivocal and it can differ when different analytes and/or different stationary and mobile phases are applied [6]. The multimodal retention mechanism has been reported in the literature. It may include ionic, hydrogen-bonding, hydrophobic and hydrophilic interactions [5–14]. Therefore, both the partition and adsorption mechanisms may contribute to the overall retention in HILIC [15]. Any polar chromatographic surface can be used for HILIC separations. In recent years, several stationary phases have emerged that are peculiar for HILIC approaches. The basic types of HILIC stationary phases consist of classical bare silica [15–20] or silica gel modified with various polar functional groups (e.g. amide- [21–23], cyano- [24–26], diol- [27–29], sulfoalkylbetaine- [30–33]), or polar molecules (e.g. cyclodextrin) [34,35]. Each of these materials display different retention characteristics and separation selectivities and require distinct buffer constitutions

[☆] Presented at the 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Anaheim, CA, USA, 16–21 June 2012.

* Corresponding author at: Faculty of Science, Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Charles University in Prague, Albertov 2030, 128 43 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 221951299; fax: +420 2 24919752.

E-mail address: kveta.kalikova@centrum.cz (K. Kalíková).

to achieve optimal results [36]. Although different types of HILIC columns are commercially available, a large fraction of the recently published works is still using conventional unmodified silica stationary phases [15–20]. However, considerable problems such as irreproducible results, strong adsorption and peaks tailing of some analytes (e.g. carbohydrates) have also been observed on bare silica columns in the HILIC mode. These problems may be caused by strong interactions of analytes with ionized silanol groups and overloading effects [15,19]. Therefore, the development of new stationary phases that consist of functionalized silica gel continues. Research in this field can broaden application possibilities of HILIC.

One of the new types of stationary phases for HILIC are cyclofructan-based columns. Cyclofructans (CFs) are cyclic oligosaccharides that consist of six or more β -(2 \rightarrow 1) linked D-fructofuranose units. Each fructofuranose unit contains one primary hydroxyl group and two secondary hydroxyl groups that are responsible for hydrophilic character of CFs [37,38]. Qui et al. firstly employed native cyclofructan 6 (CF6) as a new HILIC stationary phase. This stationary phase was successfully used for separation of nucleic acid bases, nucleosides, xanthines, β -blockers and salicylic acid and its derivatives, and carbohydrates [38]. Padivitage and Armstrong synthesized and evaluated also another type of HILIC stationary phase based on CF, i.e. sulfonated cyclofructan (SCF6) [39]. SCF6 stationary phase was shown to be suitable for the separation of β -blockers, xanthines, salicylic acid related compounds, nucleic acid bases and nucleosides, maltooligosaccharides, water soluble vitamins and amino acids in HILIC. SCF6 stationary phases seem to be very competitive with popular commercial columns.

A detailed evaluation of the separation system simplifies the optimization procedure, i.e. the choice of the proper stationary phase and composition of the mobile phase, for separation of the analytes of interest [40]. Many approaches for the characterization of separation systems can be applied. General characterization of the hydrophobicity and silanol activity of the stationary phases applied mainly in reversed-phase (RP) mode is frequently performed by the widely known and referred testing procedures designed by Walters [41], Engelhardt and Jungheim [42], Tanaka [43] and Galushko [44]. Well-proven models exist for description of retention as a function of a binary mobile phase composition [45]. These tests are mostly employed for comparative studies of the basic properties of the stationary phases [46]. The model designed by Snyder–Soczewinski [45] should give an indication on whether partitioning or adsorption is the dominating retention mechanism in HILIC separation [47].

For a better understanding of the relevant intramolecular interactions, which are dominant in the separation processes, the linear free energy relationship (LFER) model can be used [48]. LFER is a statistical model relating retention of a given analyte to its physico-chemical and structural parameters [46]. Abraham and co-workers introduced the LFER approach, based on Eq. (1), using multiple linear correlation between the retention and molecular structural descriptors [49]:

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1)$$

where k is solute retention factor. The independent variables in Eq. (1) are solute descriptors, where E is the excess molar refraction, S is the dipolarity/polarizability, A represents the effective or overall hydrogen bond acidity [49], B is the effective or overall hydrogen bond basicity [49], and V refers to the McGowan characteristic volume [50]. The selection of a representative set of analytes is essential for the system evaluation. The solutes should be structurally diverse and the distribution of the solutes descriptors should equally cover a wide range of interactions [51]. Multivariate regression analysis is applied for the determination of the coefficients

in Eq. (1) that reflect the different types of molecular interactions in the studied system. In HPLC, the regression coefficients relate to the differences in the given properties of the stationary and mobile phases. The c intercept in the LFER equation is characteristic of the given system but it does not reflect any interaction; e reflects the difference in disposition of the stationary and mobile phases to interact with n - and π -electron pairs of the solutes; a reflects the difference in hydrogen bond basicity; b refers to the difference in hydrogen bond acidity; s is equal to the difference in dipolarity/polarizability and the coefficient v describes dispersion interactions (the difference in hydrophobicity) between the two phases [49–54]. Although LFER is frequently used to characterize chromatographic RP systems, just a few papers that utilized the LFER model to describe HILIC separation systems can be found in the literature [47,55–62].

As mentioned above HILIC mode is suitable for separation of polar compounds, e.g. peptides with widespread biological activity (e.g. role in sexual reproduction, blood pressure, synthesis of hormones and other biological compounds) [63,64]. Therefore, sets of penta- and nonapeptides were selected as model compounds in this work.

The paper is aimed at evaluation of the effect of silica gel modification with cyclofructan and derivatized cyclofructan on separation abilities of HILIC separation systems. Three stationary phases are compared: bare silica column and two CF-based columns (Fruhc-N CF6, Larihc CF6-P). A systematic approach for characterization of the separation systems is used: empirical equations indicating partition and/or adsorption interaction mechanism, Walters test for general characterization of the stationary phases, and linear free energy relationship for elucidating molecular interaction mechanisms, i.e. revealing types of interactions responsible for retention. Influence of stationary phase modification and mobile phase composition on separation performance and selectivity for sets of penta- and nonapeptides is demonstrated. To the best of our knowledge (according to the literature) the Larihc CF6-P stationary phase has not been used as HILIC column yet.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

All chromatographic measurements were carried out on HPLC system Agilent HPLC series 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) consisting of an automated injector, a column oven, a degasser, a quaternary pump and photodiode array detector. For data acquisition and analysis, the Chemstation software was used.

Fruhc-N CF6 column, native cyclofructan 6 chemically bonded to silica gel, and Larihc CF6-P column, isopropyl carbamate cyclofructan 6 chemically bonded to silica gel, were obtained from AZYP (Arlington, TX, USA). A bare silica column (that contains the same silica gel material, which was used for preparation of the CF-based stationary phases) was prepared/filled at the Department of Chemistry and Biochemistry, University of Texas at Arlington (Arlington, TX, USA). The dimensions of all columns were 250 mm \times 4.6 mm i.d.; silica particle size 5 μ m.

The columns were thermostated at 25 $^{\circ}$ C and samples at 20 $^{\circ}$ C. Detection was performed at 220 nm for peptides and at 254 nm for Walters test and LFER measurements. The flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 10 μ L in all experiments. The dead time was determined using the system peak.

2.2. Chemicals and reagents

Acetonitrile (gradient grade) was supplied by Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Ammonium acetate (purity >98%) and acetic

Table 1

Set of test analytes for LFER with their solvation parameters.

Analyte	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>V</i>
Phenol	0.805	0.890	0.600	0.300	0.775
Benzamide	0.990	1.500	0.490	0.670	0.973
2-Naphthol	1.520	1.080	0.610	0.400	1.144
Resorcinol	0.980	1.000	1.100	0.580	0.834
Benzophenone	1.447	1.500	0.000	0.500	1.481
Hydroquinone	1.000	1.000	1.160	0.600	0.834
1,2-Cresol	0.840	0.860	0.520	0.310	0.916
Benzonitrile	0.742	1.110	0.000	0.330	0.871
1,3-Cresol	0.822	0.880	0.570	0.340	0.916
Benzylalcohol	0.803	0.870	0.330	0.560	0.916
Benzene	0.610	0.520	0.000	0.140	0.716
Naphthalene	1.340	0.920	0.000	0.200	1.085
Pyrocatechol	0.970	1.070	0.850	0.520	0.834
Dibenzothiophene	1.959	1.310	0.000	0.180	1.379
Toluene	0.600	0.520	0.000	0.140	0.857
1,2-Toluidine	0.966	0.920	0.230	0.450	0.957
Phenanthrene	2.055	1.290	0.000	0.260	1.454
1,2,3-Trichlorobenzene	1.030	0.860	0.000	0.000	1.084
1,2-Dichlorobenzene	0.872	0.780	0.000	0.040	0.961
3-Nitrotoluene	0.874	1.100	0.000	0.250	1.032
1,2-Xylene	0.663	0.560	0.000	0.160	0.998
Bromobenzene	0.882	0.730	0.000	0.090	0.891
2-Nitrotoluene	0.866	1.110	0.000	0.270	1.032
1,3-Xylene	0.623	0.520	0.000	0.160	0.998
Chlorobenzene	0.718	0.650	0.000	0.070	0.839
1,4-Xylene	0.613	0.520	0.000	0.160	0.998
2-Chlorophenol	0.853	0.880	0.320	0.310	0.898
3-Chlorophenol	0.909	1.060	0.690	0.150	0.898
4-Chlorophenol	0.915	1.080	0.670	0.210	0.898
2-Nitrophenol	1.015	1.050	0.050	0.370	0.949
3-Hydroxybenzaldehyde	0.990	1.380	0.740	0.400	0.932
Acetone	0.179	0.700	0.040	0.490	0.547
Anilin	0.955	0.960	0.260	0.410	0.816
Tetrachlorobenzene	1.180	0.920	0.000	0.000	1.206
Pyrene	2.810	1.710	0.000	0.290	1.585
1,4-Toluidine	0.923	0.950	0.230	0.450	0.957
Ethyl acetate	0.106	0.620	0.000	0.450	0.747
Caffeine	1.500	1.600	0.000	1.330	1.364
Theophylline	1.500	1.600	0.540	1.340	1.222
4-Nitrophenol	1.070	1.720	0.820	0.260	0.949

acid (purity >99.8%) were purchased from Lachner (Neratovice, Czech Rep.). The deionized water used in this work was purified with a Milli-Q water purification system from Millipore (Bedford, USA). The analytes for LFER measurements were of analytical grade purity and were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). They were selected to cover a wide range of chemical properties. List of 40 solutes for LFER and their corresponding descriptors are shown in Table 1. Anthracene, benzene and *N,N*-diethyl-*m*-toluamid for Walters test were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Pentapeptides, namely Leucine enkephalin acetate salt hydrate (purity >95%), Leucine enkephalinamide acetate salt (purity >98%), [Met⁵]Enkephalin acetate salt hydrate (purity >95%), [D-Ala²]Leucine enkephalin (purity >97%), and nonapeptides, namely [Lys⁸]Vasopressin (purity >98%), [Arg⁸]Vasopressin acetate salt (purity >95%), [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]Vasopressin acetate salt (purity >98%), Oxytocin acetate hydrate salt (purity >97%), [Arg⁸]Vasotocin acetate salt (purity >97%), were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA).

Stock solutions of the individual compounds of pentapeptides and nonapeptides at a concentration of 1 mg/mL were prepared by dissolving the compounds in mixture of acetonitrile/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 80/20 (v/v). The analytes for the LFER and for the Walters test were dissolved in acetonitrile at concentration of 1 mg/mL (for solid samples) and 10 µL/mL (for liquid samples).

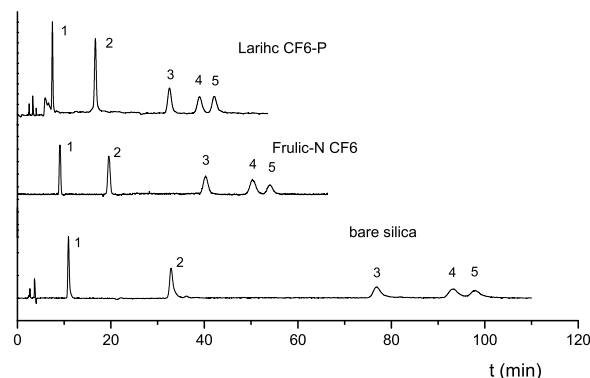


Fig. 1. Chromatograms of separation of five nonapeptides on the three tested columns. Mobile phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer; pH 4.00; 80/20 (v/v); flow rate, 1 mL/min; column temperature, 25 °C; UV detection, 220 nm. Elution order: 1, Oxytocin; 2, [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]Vasopressin; 3, [Arg⁸]Vasopressin; 4, [Arg⁸]Vasotocin; 5, [Lys⁸]Vasopressin.

2.3. Procedures

Ammonium acetate buffer was prepared by dissolving appropriate amount of ammonium acetate in deionized water and titrated with acetic acid to reach the required pH value.

In this study the effect of the ratio of organic and aqueous contents of mobile phase, the effect of buffer concentration and pH on retention and separation of nonapeptides and pentapeptides were investigated. Acetonitrile (ACN) always formed organic part of mobile phase and ammonium acetate buffer formed aqueous part of mobile phase. The effect of pH was tested within 3–6 pH units and buffer concentration in the range of 5–25 mM. The optimized pH value 4.00 and buffer concentration 20 mM was used then for detailed measurements in this study.

The three HPLC columns were characterized by the Walters test and LFER method. For the Walters test pure ACN and the mixture of ACN/deionized water 65/35 (v/v) were used as the mobile phases. Flow rate of 1 mL/min, column temperature maintained at 40 °C and detection wavelength 254 nm were used. Experimental conditions for LFER were: flow rate 1 mL/min, column temperature 25 °C and detection wavelength 254 nm. Three mobile phases were used for LFER: i.e. ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 80/20 (v/v); ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 83/17 (v/v); ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 88/12 (v/v).

The measure of retention was expressed as retention factor (*k*) for all compounds. The retention times of the test solutes were measured in triplicates in all the chromatographic systems studied. The regression coefficients of the LFER equation were obtained from a series of measurements of the retention factors of the set of 40 solutes with known solvation parameters that are summarized in Table 1. The mathematical and statistical software NCSS (Kaysville, USA) was used for multiple linear regression analysis of log *k* against solutes descriptors [65].

3. Results and discussion

3.1. Separation of peptides

The separations of two sets of analytes, five nonapeptides and four pentapeptides, were optimized on three different stationary phases (bare silica column and two CF-based columns). Fig. 1 shows separation of nonapeptides under optimized mobile phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 80/20

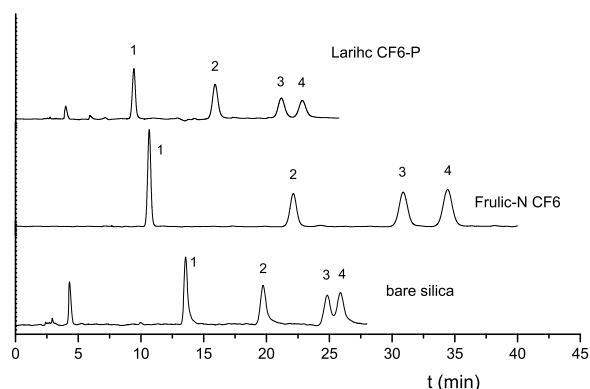


Fig. 2. Chromatograms of separation of four pentapeptides on the three tested columns. Mobile phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer; pH 4.00; 88/12 (v/v); flow rate, 1 mL/min; column temperature, 25 °C; UV detection, 220 nm. Elution order: 1, Leucine enkephalinamide; 2, [D-Ala²]-Leucine enkephalin; 3, Leucine enkephalin; 4, [Met⁵]Enkephalin.

(v/v). The elution order of nonapeptides was the same for all columns: Oxytocin, [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]-Vasopressin, [Arg⁸]-Vasopressin, [Arg⁸]-Vasotocin and [Lys⁸]-Vasopressin. The shortest time of analysis was obtained on the derivatized cyclofructan-based SP (Larihc CF6-P); the column also provided good peak symmetry and separation performance. On the other hand the longest analysis time was obtained for the bare silica column and was accompanied by peak tailing, mainly of Oxytocin, [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]-Vasopressin and [Arg⁸]-Vasopressin. Separations of the set of pentapeptides at mobile phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 88/12 (v/v) are shown in Fig. 2. This mobile phase composition was found to be the best for separation systems with bare silica and Larihc-P columns. The elution order of pentapeptides also was the same for all SPs tested: Leucine enkephalinamide, [D-Ala²]-Leucine enkephalin, Leucine enkephalin, [Met⁵]Enkephalin. The optimized mobile phase for separation of pentapeptides using underivatized CF6 column (Frulic-N CF6) was acetonitrile/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 83/17 (v/v), in this separation system the time of analysis did not exceed 13 min and all the analytes were baseline separated and showed good peak symmetry. The set of pentapeptides was also baseline resolved within 25 min using Larihc CF6-P column under mobile phase composed of ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 88/12 (v/v). A bare silica column was not suitable for separation of pentapeptides because of Leucine enkephalin and [Met⁵]Enkephalin were not baseline separated at any mobile phase composition and other analytes exhibited peak tailing. The change of ACN/buffer ratio in the mobile phase only affected the retention but had negligible impact on resolution of the critical pair of pentapeptides. CF-based SPs showed better selectivity for pentapeptides than bare silica SP. The selectivity values (α) for analytes 3 and 4 increased from 1.05 (on bare silica SP) to 1.09 and 1.14 for Larihc CF6-P and Frulic-N CF6 columns, respectively.

Comparison of the results obtained on these three separation columns shows that the CF-based stationary phases (Larihc CF6-P and Frulic-N CF6) are suitable for separation of nonapeptides and pentapeptides under HILIC conditions while worse results are obtained with the bare silica column.

The strongest impact on retention of peptides was induced by changing buffer/organic solvent ratio. When logarithm of retention factor of an analyte is plotted against the volume fraction of aqueous part of the mobile phase the empirical equation proposed by

Table 2
Results of the Walters chromatographic test.

	Column		
	Bare silica	Frulic-N CF6	Larihc CF6-P
HI (hydrophobicity)	0.73	0.13	0.69
SI (silanol activity)	2.46	2.30	2.37

Schoenmakers et al. [66] should provide description of partitioning mechanism:

$$\log k = A\varphi^2 + B\varphi + C \quad (2)$$

where φ is the volume proportion of water in the mobile phase.

A linear plot of $\log k$ vs. \log (mole fraction of water) should indicate adsorption process, according to the Snyder–Soczewinski expression:

$$\log k = \log kw - \frac{A_s}{n_w} \log N_w \quad (3)$$

where k_w is the hypothetical retention factor when the mobile phase is purely aqueous, A_s and n_w are the cross-sectional areas occupied by the solute molecule on the surface and the water molecules, respectively, and N_w is the mole fraction of water in the eluent [45].

Fig. 3 shows the dependencies of $\log k$ of nonapeptides plotted against the volume fraction of water and against the log of mole fraction of water for all three separation columns. Fitting dependencies of $\log k$ on the volume fraction of water according Eq. (2) provides correlation coefficients over 0.9977 and 0.9941 for underivatized and derivatized CF6 columns, respectively, and 0.9834 for the bare silica column (where data for [Arg⁸]-Vasotocin and [Lys⁸]-Vasopressin for high percentage of acetonitrile could not be included because these analytes did not elute within 3 h) for all studied nonapeptides. Dependencies of $\log k$ on the logarithm of the mole fraction of water fit very well the linear regression curve (Eq. (3)), with correlation coefficients higher than 0.9991 for Frulic-N CF6 column, 0.9925 for Larihc CF6-P column and 0.9862 for a bare silica column for all studied nonapeptides. Very similar results were obtained for all pentapeptides (results not shown). The both retention models, partitioning and adsorption (Eqs. (2) and (3), respectively) seem to fit well the retention data of the peptides in our study. Based on these results and literature references [45,66] a multimodal retention mechanism can be presumed. On the contrary, other authors have shown better fit of HILIC data using the Snyder–Soczewinski equation than the partitioning model [5,15].

3.2. Characterization of interactions in the separation systems

Simple chromatographic test by Walters that was designed originally for characterization of column hydrophobicity and silanol activity in RP mode can be employed also for other separation systems. A modified interpretation of this test can offer basic information for characterization/comparison of HILIC stationary phases. The hydrophobicity parameter (HI) is calculated as separation factor (α) of anthracene/benzene using 65% ACN as a mobile phase [40]. HI can be interpreted as selectivity for a specific molecular increment. Silanol activity index (SI) is evaluated by separation factor of compounds with different acid/base character *N,N*-diethyl-*m*-toluamid/anthracene in pure ACN as a mobile phase. The results of Walters test are given in Table 2. The hydrophobicity parameter does not play a significant role on these polar stationary phases. The HI values are very low, clearly not comparable with reversed-phases. (The HI values for ordinary RP SPs range approx. between 2 and 4 [67].) However, the lowest value obtained on the underivatized CF SP corresponds well with its

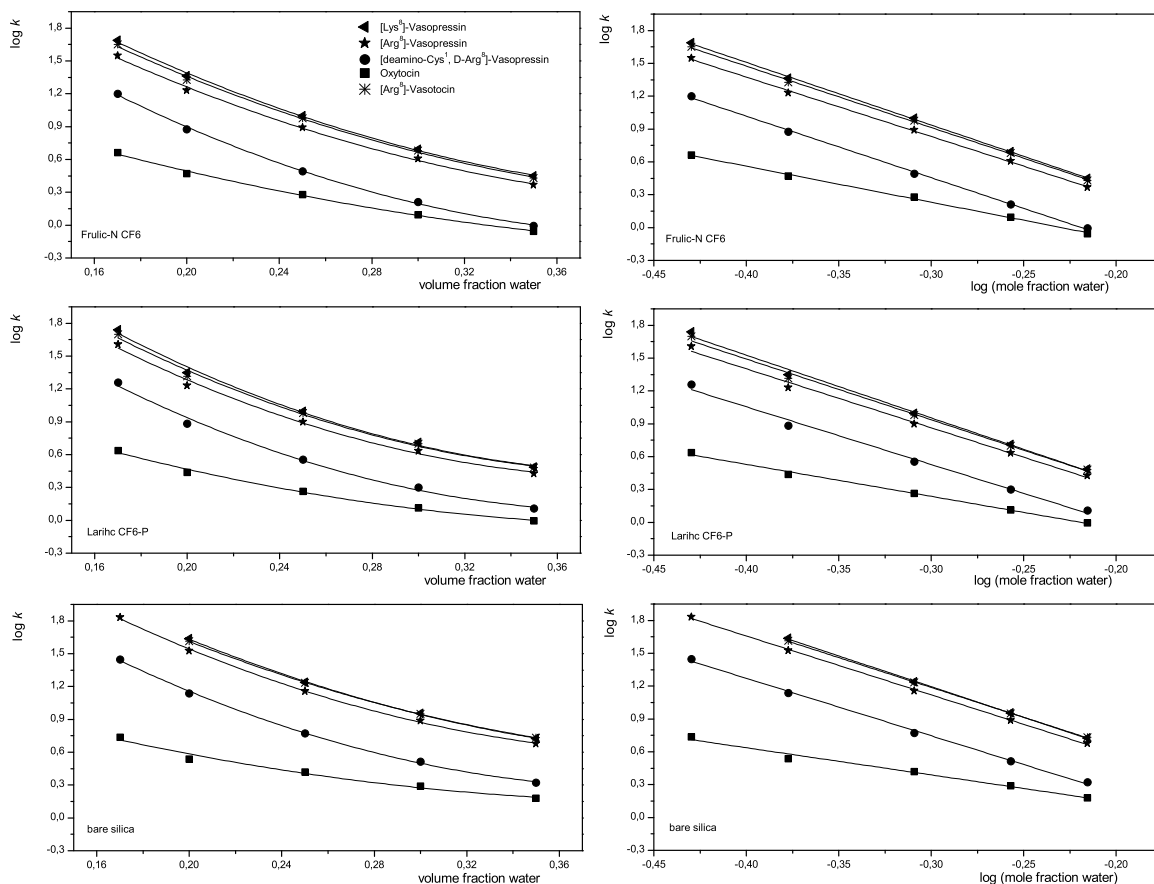


Fig. 3. Dependencies of $\log k$ of five nonapeptides on volume fraction of water and on the logarithm of the mole fraction of water obtained for the three tested columns. 20 mM ammonium acetate buffer; pH 4.00; represents aqueous part of the mobile phase. For more details see Section 2.

highest hydrophilic character caused by many polar groups of CF, in addition to silanol groups of the carrier. If the hydroxyl groups of the native CF are substituted with isopropyl the HI value increases (Larihc CF6-P column). The highest HI value was obtained on bare silica SP, which corresponds with LFER results (will be discussed further). In some cases, depending on polarity of analytes but also on polarity of stationary phase and organic solvent content in mobile phase hydrophobic interaction can still be considered part of the interaction mechanism [2]. The low HI values show relevance of these SPs for application in HILIC. The tested HILIC columns show higher silanol activity (SI) compared to RP columns [67], this is in agreement with the structure of these SPs. The silanol activity values are rather similar for all these SPs. The modification of silica support by bonding cyclofructan had only negligible effect on the SI values. However, the separation results (Figs. 1 and 2) show that the modification of silica gel by CF and/or isopropylated CF affects substantially the properties of the SPs.

As adsorption is a part of retention/separation mechanism in HILIC the LFER method was used for characterization of interactions that play the major role in chromatographic systems with these stationary phases. The obtained LFER results for the separation systems studied are summarized in Table 3. The table shows only statistically significant regression coefficients and their p -values. Correlation of the experimental $\log k$ with calculated $\log k$ did not show any serious outliers, correlation coefficients of linear regression fits were always higher than 0.97 (only for bare silica column the values were about 0.91).

The distribution of positive and negative values of obtained regression coefficients corresponds with general properties of normal phase (NP) mode. It is logical because the HILIC stationary phases have higher polarity than mobile phases, like in NP mode.

The regression coefficient e (related to the disposition of the system to interact with n and π electrons of analytes) is statistically significant only in the system composed of underivatized CF6 column and ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 80/20 (v/v) as a mobile phase. The negative value of the coefficient means that this interaction type is stronger in the mobile phase, it lowers retention of analytes that have ability for this interaction type.

The regression coefficient s (reflecting difference in dipolarity/polarizability) is positive and statistically significant only in systems with CF-based SPs because they contain many polar and polarizable groups. The value of this coefficient slightly increases with increasing volume of buffer in the mobile phase. The values can be influenced by sorption of mobile phase components on the surface of stationary phases. Higher value of s coefficient was obtained on underivatized CF6 column than on isopropyl CF6 column. The derivatization of hydroxyl groups of native CF6 by isopropyl groups lower dipolarity/polarizability of the latter column. The regression coefficient s in system with bare silica SP is statistically insignificant in all mobile phases tested. It means that this type of interaction is equal in the mobile and stationary phases and does not significantly contribute to retention.

The highest positive values among all regression coefficients of LFER equation for all tested chromatographic systems were

Table 3
Regression coefficients (significant values in bold) of the LFER equation and correlation coefficient *R*.

Column/SP	Mobile phase	Complete LFER model							<i>R</i>
		Model	<i>e</i>	<i>s</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>v</i>	<i>c</i>	
Bare silica	ACN/buffer 88/12 (v/v)	C.M.	x	x	x	0.468	x	−0.637	0.91
		<i>p</i> -value	0.833	0.604	0.742	0.000	0.865	0.000	
		±CI				0.100		0.176	
Frulic-N CF6 native CF6	ACN/buffer 88/12 (v/v)	C.M.	x	0.124	x	0.802	−0.541	−0.681	0.98
		<i>p</i> -value	0.607	0.020	0.074	0.000	0.000	0.000	
		±CI		0.1		0.083	0.221	0.145	
Larihc CF6-P Isopropyl CF6	ACN/buffer 88/12 (v/v)	C.M.	x	x	x	0.619	−0.315	−0.567	0.97
		<i>p</i> -value	0.722	0.093	0.892	0.000	0.002	0.000	
		±CI				0.072	0.194	0.127	
Bare silica	ACN/buffer 83/17 (v/v)	C.M.	x	x	x	0.463	x	−0.696	0.93
		<i>p</i> -value	0.652	0.442	0.452	0.000	0.868	0.000	
		±CI				0.084		0.148	
Frulic-N CF6 Native CF6	ACN/buffer 83/17 (v/v)	C.M.	x	0.214	x	1.057	−0.983	−0.636	0.99
		<i>p</i> -value	0.915	0.000	0.113	0.000	0.000	0.000	
		±CI		0.11		0.089	0.238	0.156	
Larihc CF6-P Isopropyl CF6	ACN/buffer 83/17 (v/v)	C.M.	x	0.094	x	0.680	−0.464	−0.580	0.97
		<i>p</i> -value	0.470	0.046	0.651	0.000	0.000	0.000	
		±CI		0.093		0.074	0.199	0.130	
Bare silica	ACN/buffer 80/20 (v/v)	C.M.	x	x	x	0.476	x	−0.698	0.91
		<i>p</i> -value	0.827	0.808	0.524	0.000	0.757	0.000	
		±CI				0.095		0.167	
Frulic-N CF6 Native CF6	ACN/buffer 80/20 (v/v)	C.M.	−0.410	0.426	x	1.454	−1.382	−0.459	0.97
		<i>p</i> -value	0.005	0.006	0.080	0.000	0.000	0.031	
		±CI	0.277	0.294		0.235	0.630	0.413	
Larihc CF6-P Isopropyl CF6	ACN/buffer 80/20 (v/v)	C.M.	x	0.104	x	0.725	−0.535	−0.575	0.98
		<i>p</i> -value	0.616	0.024	0.435	0.000	0.000	0.000	
		±CI		0.090		0.071	0.191	0.125	

CI represents ±95% confidence interval. x, insignificant difference in interaction of the solute with the mobile and stationary phases; *p*, statistical *p*-value. The *p*-values express the probability of the error that the individual coefficient does not contribute to the model, i.e. *p*-values represent the significance of the individual coefficients. The buffer used as mobile phase component was 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00.

achieved for coefficient *b*. That means that hydrogen bond acidity of SPs significantly contributes to retention of analytes that have abilities to interact by this type of interaction. The same results were obtained for CF-based stationary phases under normal phase conditions [52]. The lowest hydrogen donating properties offered the bare silica column. Moreover, the *b* value was not affected by the ACN/buffer ratio in the studied range for silica. CF-based SPs contain additional groups that can contribute to this interaction type. The highest values of *b* coefficient resulted from underivatized CF6 column, and these *b* values even increased with increasing amount of buffer in the mobile phase. This result supports the notation that aqueous part of the mobile phase (buffer) is deposited on the SP in HILIC. Derivatization with isopropyl groups decreases the number of interaction sites, and so, decreases hydrogen donating properties of the derivatized CF6-based stationary phase. Also the increase of *b* coefficient with buffer content in the mobile phase was less significant on the derivatized CF6 column than on the underivatized one.

The regression coefficient *v*, expressing dispersion forces participating in the separation system, was negative in all studied chromatographic systems (with exception of the bare silica column where this interaction type is statistically insignificant). This is legitimate in a normal separation mode [47], and thus also in HILIC as HILIC is considered a subset of NP mode. The changes of dispersion interactions, mostly called hydrophobicity in RP systems, obtained by LFER confirm the results calculated from the Walters test. The results in Table 2 support the explanation that the dispersion interactions (hydrophobicity) contribute to the interaction mechanism of peptides on the studied SPs. The highest hydrophobicity value by Walters test showed bare silica column and by LFER the “hydrophobicities” of this column and mobile phase were comparable. The lowest “hydrophobicity” resulted from both evaluations (Walters test and LFER) for the underivatized CF6 column. Regression coefficient *v* values exhibited a clearly defined trend,

i.e. the difference in “hydrophobicity” of the SP and mobile phase increased with the buffer contents in the mobile phase for both CF-based SPs. In addition, the *v* values were most affected by the mobile phase composition on the underivatized CF6 SP. The derivatization of the native CF6 SP by isopropyl groups decreased polar character of the stationary phase. These results are most probably influenced by sorption of polar components of the mobile phase on the stationary phase surfaces. The negative *v* values and their trend related to the ACN-to-buffer ratio are opposite to that in RP chromatographic systems [40,68].

The regression coefficient *a* is statistically insignificant in all the studied systems. It means that the hydrogen bond basicity (ability to accept protons) of the stationary and the mobile phases is comparable.

In summary, the greatest impact on retention and simultaneously on the major changes of regression coefficient values with composition of the mobile phase were observed for the dispersion interactions and hydrogen bond acidity, i.e. *v* and *b* coefficients of LFER equation, respectively, on the CF-based SPs. On the bare silica column, hydrogen bond acidity showed positive value but lower than on the CF modified stationary phases and it was almost unaffected by mobile phase composition, and dispersion interactions were insignificant. In addition, dipolarity/polarizability, *s*, seems to be important for selectivity and retention on CF-based columns, mainly in mobile phases with higher buffer contents. It should also be noted that CF is bonded to silica gel by the carbamate group, which can also contribute to the interaction mechanism.

3.3. Correlation between LFER results and retention results of peptides

LFER method was carried out under optimized separation conditions for the sets of penta- and nonapeptides. Although adsorption represents only part of separation mechanism in HILIC the LFER

results help to clarify the chromatographic behavior of the selected peptides. The set of pentapeptides was not completely resolved (third and fourth peaks coeluted) at any tested mobile phase composition on bare silica column. The column offers just one type of interaction, i.e. hydrogen bond acidity according LFER. So, partitioning of analytes between the bulk mobile phase and the aqueous layer deposited on the surface of the stationary phase is probably the main interaction type in systems with bare silica SP. The partitioning and hydrogen bond acidity provide sufficient retention but not selectivity. The highest retention and baseline separation of pentapeptides were obtained on Frulic-N CF6 column with ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 88/12 (v/v) as mobile phase. This separation system offers most interaction types and the highest values of the corresponding regression coefficients if compared with other tested columns under the same mobile phase composition. Derivatized CF6 column with ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 88/12 (v/v) as a mobile phase is also suitable for separation of pentapeptides. This separation system provides lower retention than that with underivatized CF6 column, which corresponds with the dipolarity/polarizability that is equal on the SP and in the mobile phase in the latter separation system.

The optimized mobile phase composition for separation of nonapeptides was ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 80/20 (v/v) for all three columns (Fig. 1). The main difference related to the separation of nonapeptides (as compared to pentapeptides) was the great increase of the analyses time with the highest retention obtained on bare silica column. If CF-based SPs are compared the retention trend of nonapeptides is similar to that of pentapeptides. The separation system with Larihc CF6-P provides lower retention than that with Frulic-N CF6 column because it reaches lower values of positive regression coefficients *b* and *s* on the former column.

4. Conclusions

Three HILIC columns, i.e. bare silica and two CF-based stationary phases were investigated and compared in terms of separation performance of sets of peptides and interaction abilities that determine retention mechanism. The bare silica column showed the lowest separation performance for the tested peptides. Modification of silica gel with cyclofructans resulted in improved separation performance and selectivity. Then slightly higher selectivity demonstrated the underivatized CF column (Frulic-N CF6 column).

The obtained retention results for the two groups of peptides indicate a multimodal retention mechanism on all three tested columns.

The Walters test was used for determination of hydrophobicity and silanol activity of the SPs. Silanol index values were similar for all these SPs. Nevertheless, as presumed the highest silanol activity was obtained for the bare silica column. Hydrophobicity resulting from the Walters test was low, as could be expected. The bare silica column exhibited the highest hydrophobicity, which was in agreement with the LFER results. The lowest hydrophobicity offered the underivatized CF-based SP (Frulic-N CF6 column) because it contains many additional polar groups.

The interactions participating in the retention and separation mechanism were identified and quantified using LFER. From the qualitative point of view interaction abilities of both CF-based SPs are similar whereas the bare silica SP shows only one interaction type. The adsorption mechanism is controlled only by hydrogen bond acidity there.

LFER results denoted that the main role in the interaction mechanism on the CF-based SPs play hydrogen bond acidity and dipolarity/polarizability, while dispersion interactions are preferred in the mobile phase.

Despite the fact that bare silica gel is often used as stationary phase in HILIC our study shows that modification of the silica gel with polar groups/compounds can substantially improve its separation performance. Modification of silica gel with cyclofructans and their possible further derivatization indicates that CFs can serve as promising modulators for preparation of HILIC SPs of desired properties, interaction abilities and selectivities for separation of biologically active compounds.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge financial support of the KONTAKT AM 2010 project LH11018, the Grant Agency of the Charles University in Prague, project no. 356411, SVV 2012265201, project UNCE 2012/44 and the long-term research plan of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, MSM 0021620857. We are grateful to Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) for supporting us with HPLC equipment.

References

- [1] M.A. Stregge, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2439.
- [2] P. Jandera, *Anal. Chim. Acta* 692 (2011) 1.
- [3] B. Buszewski, S. Noga, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231.
- [4] A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177.
- [5] Ch. Wang, Ch. Jiang, D.W. Armstrong, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1980.
- [6] Z. Hao, B. Xiao, N. Weng, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1449.
- [7] F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1099 (2005) 1.
- [8] A. Berthod, S.S.C. Chang, J.P.S. Kullman, D.W. Armstrong, *Talanta* 47 (1998) 1001.
- [9] T. Yoshida, *J. Biochem. Biophys. Methods* 60 (2004) 265.
- [10] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 46.
- [11] D.V. McCalley, U.D. Neue, *J. Chromatogr. A* 1192 (2008) 225.
- [12] B. Buszewski, S. Bocian, E. Dziubakiewicz, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1529.
- [13] P. Jandera, J. Urban, V. Škeříková, P. Langmaier, R. Kubíčková, J. Planeta, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 22.
- [14] T. Zhou, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 82.
- [15] P. Hemstrom, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784.
- [16] W. Naidong, *J. Chromatogr. B* 796 (2003) 209.
- [17] J.J. Kirkland, C.H. Dills, J.J. Destefano, *J. Chromatogr.* 635 (1993) 19.
- [18] M.A. Stregge, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2439.
- [19] R.P. Li, J.X. Huang, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 163.
- [20] B. Chauve, D. Guilleme, P. Cléon, J.-L. Veuthey, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 752.
- [21] G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 246.
- [22] Y. Guo, S. Gaiki, *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 71.
- [23] L. Nováková, I. Kaufmannová, R. Jánková, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 765.
- [24] Z. Daunoravicius, I. Juknaite, E. Naujalis, A. Padarauskas, *Chromatographia* 63 (2006) 373.
- [25] T. Yoshida, T. Okada, *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 1.
- [26] K. Kaczmarek, W. Prus, T. Kowalska, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 57.
- [27] P. Jandera, T. Hájek, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3603.
- [28] H. Tanaka, X. Zhou, O. Masayoshi, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 119.
- [29] C. Zhu, A. Dane, G. Spijskma, M. Wang, J. van der Greef, G.A. Luo, T. Hankemeier, R.J. Vreeken, *J. Chromatogr. A* 1220 (2012) 26.
- [30] G. Marrubini, B.E.C. Mendoza, G. Massolini, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 803.
- [31] L. Zheng, D.G. Watson, J.N.A. Tetley, C.A. Clements, *Talanta* 76 (2008) 1165.
- [32] S. Vikingsson, R. Kronstrand, M. Josefsson, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 46.
- [33] K.L. Wade, I.J. Garrard, J.W. Fahey, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 469.
- [34] D.W. Armstrong, H.L. Jin, *J. Chromatogr.* 462 (1989) 219.
- [35] Z. Guo, Y. Jin, T. Liang, Y. Liu, Q. Xu, X. Liang, A. Lei, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 257.
- [36] P.J. Boersema, S. Mohammad, A.J.R. Heck, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 151.
- [37] S. Immler, G.E. Schmitt, F.W. Lichtenthaler, *Carbohydr. Res.* 313 (1998) 91.
- [38] H. Qiu, L. Loukotková, P. Sun, E. Tesařová, Z. Bosáková, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 270.
- [39] N.L.T. Padivitage, D.W. Armstrong, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1636.
- [40] K. Kalíková, J. Lokajová, E. Tesařová, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1476.
- [41] M.J. Walters, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 (1987) 465.
- [42] H. Engelhardt, M. Jungheim, *Chromatographia* 29 (1990) 59.
- [43] K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 721.
- [44] S.V. Galushko, *Chromatographia* 36 (1993) 39.
- [45] L.R. Snyder, H. Poppe, *J. Chromatogr.* 184 (1980) 363.
- [46] L. Janečková, K. Kalíková, Z. Bosáková, E. Tesařová, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3043.
- [47] R. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A. Finaru, C. Elfakir, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5939.
- [48] M.J. Kamlet, R.M. Doherty, J.L.M. Abboud, M.H. Abraham, R.W. Taft, *Chem. Tech.* 16 (1986) 566.
- [49] M.H. Abraham, G.S. Whiting, R.M. Doherty, W. Shuely, *J. Chromatogr.* 587 (1991) 213.
- [50] M.H. Abraham, J. McGowan, *Chromatographia* 23 (1987) 243.

- [51] M.H. Abraham, J.A. Haftvan, G.S. Whiting, A. Leo, R.S. Taft, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 (8) (1994) 1777.
- [52] L. Janečková, K. Kalíková, J. Vozka, D.W. Armstrong, Z. Bosáková, E. Tesařová, J. Sep. Sci. 24 (2011) 2639.
- [53] K. Kalíková, L. Janečková, D.W. Armstrong, E. Tesařová, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1393.
- [54] E.C. Vonk, K. Lewandowska, H.A. Claessens, R. Kaliszan, C.A. Cramers, J. Sep. Sci. 26 (2003) 777.
- [55] N.S. Quiming, N.L. Denola, Y. Saito, A.P. Catabay, K. Jinno, Chromatographia 67 (2008) 507.
- [56] P. Jandera, T. Hájek, V. Škeříková, J. Soukup, J. Sep. Sci. 33 (2010) 841.
- [57] N.S. Quiming, N.L. Denola, Y. Saito, K. Jinno, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 1693.
- [58] N.S. Quiming, N.L. Denola, Y. Saito, K. Jinno, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1550.
- [59] N.S. Quiming, N.L. Denola, S.R.B. Samsuri, Y. Saito, K. Jinno, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1537.
- [60] M. Michel, T. Baczek, S. Studzinska, K. Bodzioch, T. Jonsson, R. Kaliszan, B. Buszewski, J. Chromatogr. A 1175 (2007) 49.
- [61] N.S. Quiming, N.L. Denola, I. Ueta, Y. Saito, S. Tatematsu, K. Jinno, Anal. Chim. Acta 598 (2007) 41.
- [62] M. Michel, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 33 (2010) 239.
- [63] E.E. Storm, H.L. Tecott, Neuron 47 (2005) 483.
- [64] D.L. Goldstein, Gen. Comp. Endocrinol. 147 (2006) 78.
- [65] J.L. Hintze, NCSS User's Guide II, NCSS, Kaysville, UT, USA, 2007.
- [66] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. De Galan, J. Chromatogr. 218 (1981) 261.
- [67] P. Jandera, K. Novotná, M.S. Beldean-Galea, K. Jiřa, J. Sep. Sci. 29 (2006) 856.
- [68] A. Sandi, M. Nagy, L. Szepeszy, J. Chromatogr. A 893 (2000) 215.

PUBLIKACE III

PROPERTIES OF TWO AMIDE-BASED HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY COLUMNS

Kalíková, K.; Kozlík, P.; Gilar, M.; Tesařová, E.

J. Sep. Sci 36 (2013) 2421-2429.

Květa Kalíková¹
Petr Kozlák²
Martin Gilar³
Eva Tesařová¹

¹Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

³Waters Corporation, Milford, MA, USA

Received February 28, 2013

Revised May 6, 2013

Accepted May 9, 2013

Research Article

Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns[†]

Hydrophilic interaction liquid chromatography is a separation technique suitable for the separation of moderately and highly polar compounds. Various stationary phases (SPs) for hydrophilic interaction liquid chromatography are commercially available. While the SPs based on the same type of ligand are available from different providers, they can display a distinct retention characteristics and separation selectivity. The current work is focused on characterization and comparison of the separation systems of two amide-based HPLC columns from two producers, i.e. XBridge Amide column and TSK gel Amide-80 column. Several characterization procedures (tests) were used to investigate the differences between these columns. The chromatographic behavior of selected analytes indicates that multimodal interactions are responsible for retention and separation on these columns. Multiple testing approaches were used in order to reveal subtle differences between the SPs. Both amide-based columns showed certain differences in retention, selectivity, and plate counts. Based on the tests used in this study, we conclude that the investigated columns provide a different degree of H-bonding interactions.

Keywords: Amide-based columns / Hydrophilic interaction liquid chromatography / Linear free energy relationship / Peptides / Selectivity tests
DOI 10.1002/jssc.201300232



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

1 Introduction

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is now an established chromatographic method for the separation of polar and hydrophilic compounds. HILIC can be defined as a separation mode that employs stationary phases (SPs) usually used in the normal-phase mode and mobile phases used in the RP mode [1]. Typical applications of HILIC include the separation of polar drugs [2], metabolites [3], and biologically important compounds in proteomics, glycomics, and clinical analysis [4, 5]. The analytes interact with the hydrophilic SP in the presence of relatively more hydrophobic mobile phase, and their elution is typically realized by water as a strong eluting solvent. In 1990, the term HILIC was first suggested by Alpert [6], although some authors had used HILIC as a separation mode before [1, 7, 8]. Nevertheless, the exact nature of HILIC retention mechanism is still debated.

Current consensus is that the most dominant retention mechanism in HILIC is a partitioning of analytes between a hydrophobic mobile phase and a layer of the aqueous part

of the mobile phase enriched at the surface of the polar SP [4, 9, 10]. However, electrostatic interactions, hydrogen bonding, dispersion, and other interactions also take part [1, 5, 11, 12] in HILIC retention. The HILIC mechanism is believed to be complex, as discussed in detail in some review articles [5, 13].

A number of commercially available columns designed especially for HILIC are available and still growing. Under the HILIC conditions, various polar SPs can be employed (see the review by Jandera [5]). Classical bare silica [14, 15], or silica modified with various polar functional groups, e.g. amide [16], cyano [17], diol [18], and sulfoalkylbetaine groups [19], or polar molecules, e.g. cyclodextrins [20] and cyclodextrins [21, 22] (also used as chiral SPs [23, 24]) are among the selected examples.

Much effort has been spent on understanding the retention and selectivity behavior in LC in general in order to control and predict chromatographic properties of separation systems. The characterization of separation systems can be performed by many different methods. These methods rely on experimentally acquired chromatographic data using test compounds selected to probe specific sorbent properties [25]. General characterization of hydrophobicity, and silanol activity of SPs is frequently performed by the widely used procedures designed by Walters [26], Engelhardt and Jungheim [27], Tanaka [28], and Galushko [29]. Other

Correspondence: Dr. Eva Tesařová, Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 2030, 12843 Prague, Czech Republic
E-mail: tesarove@natur.cuni.cz
Fax: 1420-224-919-752

Abbreviations: ACN, acetonitrile; Boc, *tert*-butoxycarbonyl; HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography; LFER, linear free energy relationship; SP, stationary phase

[†]This paper is included in the virtual special issue HILIC available at the Journal of Separation Science website.

tests can be used for the characterization and comparison of SPs, e.g. selectivity tests for methylene groups [28], and for hydroxy groups [30], and selectivity for amino group [31, 32]. These tests are mostly employed for comparative studies of the basic properties of SPs [33]. The prevailing HILIC retention mechanism, partitioning or adsorption, can be investigated by the Schoenmaker [34] or Snyder–Soczewinski models [35]. Ionic interactions can also substantially influence the separations of ionizable compounds. One of the approaches for probing the ion-exchange interactions is the application of a set of basic compounds covering a wide range of log *P* and p*K*_a values. Such test can be used to reveal both hydrophobicity and ion exchange interactions contributions to retention in RP chromatography [33, 36].

The column temperature can affect analyte retention and selectivity based on thermodynamic considerations [37]. The temperature can change the enthalpy of an analyte transfer from the mobile phase to the SP [38] and the analyte conversion rate between different conformations [39]. The enthalpy and entropy contributions to chromatographic retention, selectivity, and resolution can be derived from van't Hoff plots [25]. These plots may also provide information on the retention mechanism changes over the studied temperature range [40].

Greater insight into the complex mechanism that governs the retention of solutes in a particular chromatographic system can be obtained from the use of linear free energy relationship (LFER) model. This model has been widely used to characterize chemical and biochemical processes. An introduction, practical aspects, chemical meaning, and application of LFER in chromatography are given in [41, 42]. The LFER method is based on the relationship between the phase-transfer process of the analyte and the change of the Gibbs energy of the system [43]. This mathematical/statistical model estimates the physicochemical properties of the SP from the experimentally obtained retention of analytes of known physicochemical parameters [33]. The main benefit of the LFER model lies in its ability to describe the contributions of individual types of molecular interactions to the retention process [33]. The overall applicability of the LFER model has been presented in numerous reports for RP mode of chromatography and chiral chromatography in recent years [33, 44, 45]. The LFER method has also been successfully applied in HILIC [19, 22, 46, 47].

Different SPs usually display different retention characteristics and separation selectivity. Even sorbents based on the same type of ligand can display different interaction possibilities (e.g. due to different chemical binding or base sorbent support) and thus different chromatographic properties. The aim of this work is to employ different methods for the characterization of SPs and use these tests to evaluate two selected amide-based HILIC columns. Peptides, nucleobases, and small molecules were selected as model compounds with the intent to probe the chromatographic interactions of the chosen SPs and demonstrate their applicability for separation of biologically important compounds. A systematic approach for characterization of the separation systems is used. We

employed the LFER model, general tests for characterization of the SPs (e.g. selectivity for methylene, hydroxy, and amino groups), basic compounds testing approach, and a study of the effect of separation temperature.

2 Materials and methods

2.1 Instrumentation

All chromatographic measurements were performed on a Waters Alliance system (Waters Chromatography, Milford, USA) consisting of a 2695 Separation Module, 2996 Photodiode Array Detector, 717 plus autosampler, and Alliance Series column heater. Empower software was used for data acquisition and analysis. The two amide-based SPs used were XBridge™ Amide (column size 250 × 4.6 mm, particle size 3.5 μm, pore size 130 Å) from Waters (Milford, USA) and TSK gel Amide-80 (column size 250 × 4.6 mm, particle size 5 μm, pore size 80 Å) from Tosoh (Tokyo, Japan).

2.2 Chemicals and reagents

Acetonitrile (ACN, gradient grade), ammonium acetate (purity ≥ 99%), and acetic acid (purity > 99.8%) were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Sodium hydroxide (purity > 98%) was purchased from Lachner (Neratovice, Czech Republic). The deionized water used in this work was purified with a Milli-Q water purification system from Millipore (Bedford, USA). A set of peptides, consisting of leucine enkephalin acetate salt hydrate (purity > 95%), leucine enkephalinamide acetate salt (purity > 98%), [Met⁵]enkephalin acetate salt hydrate (purity > 95%), [D-Ala²]leucine enkephalin (purity > 97%), and test solutes for LFER measurements were purchased from Sigma-Aldrich. The list of 39 solutes for LFER, which cover a wide range of chemical properties, and their corresponding descriptors are shown in Supporting Information Table S1 [48, 49]. Uridine, 5-methyluridine, 2'-deoxyuridine; nucleobases including thymine, uracil, adenine, cytosine, and guanine; a set of amino acids and their *tert*-butoxycarbonyl (Boc) protected analogs, i.e. L-tryptophan, D-phenylalanine, L-tyrosine, N-Boc-L-tryptophan, N-Boc-D-phenylalanine, and N-Boc-L-tyrosine, used for selectivity tests were purchased from Sigma-Aldrich. A set of basic compounds listed in Table 4 was also purchased from Sigma-Aldrich.

Stock solutions of the individual compounds of peptides at a concentration of 1 mg/mL were prepared by dissolving the compounds in a mixture of ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85:15 v/v. The analytes for the LFER were dissolved in ACN at concentration of 1 mg/mL (for solid samples) and 10 μL/mL (for liquid samples). The analytes for other tests were dissolved in ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85:15 v/v also at concentration of 1 mg/mL (for solid samples) and 10 μL/mL (for liquid samples) except guanine, which was dissolved in 0.1 M sodium hydroxide due to its poor solubility in ACN.

2.3 Procedures

Retentions of analytes are expressed as retention factors (k). All measurements were performed in triplicate. Dead time was determined by the solvent peak. Ammonium acetate buffer was prepared by dissolving appropriate amount of ammonium acetate in deionized water and adjusted with acetic acid to reach the required pH value. Mobile phases consisted of ACN and ammonium acetate buffer, and the retention of peptides was investigated at various volumetric ratios of ACN to buffer.

The LFER measurements and the other tests, namely, the selectivity for methylene, hydroxy, and amino groups, chromatographic behavior of nucleobases and basic compounds, were performed under the following experimental conditions: the mobile phase used was ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85:15 v/v, flow rate 1 mL/min, injection volume 10 μ L, column temperature 25°C, and detection wavelengths 220 or 254 nm. The effect of column temperature on retention of the nucleobases uridine, and its derivatives was studied in the range of 10–40°C (with 5°C steps). The mathematical and statistical software NCSS (Kaysville, USA) was used to perform multiple linear regression analysis of $\log k$ versus the solute descriptors.

3 Results and discussion

3.1 Separation of biologically important compounds

Two amide-based columns were compared in HILIC mode using short peptides and nucleobases. Column characteristics, such as retention, resolution, and plate count were measured with two sets of compounds with certain structural

differences. The separation of peptides on both columns is shown in Fig. 1A. Better separation was obtained on the XBridge amide column compared to the TSK gel Amide-80 column under the same chromatographic conditions (see Fig. 1A captions); this is in part due to the higher chromatographic efficiency of the former column. The difference in resolution can also be attributed to the shift in separation selectivity for critical pair of leucine enkephalinamide and [D-Ala²] leucine-enkephalin; the leucine enkephalinamide is the only peptide in the test mixture with amidated carboxylic terminal moiety. The baseline resolution of peptides on the TSK gel Amide-80 column can be achieved by increasing the ACN percentage in the mobile phase to 88%; however, the analysis time increases to 25 min.

The chromatographic behavior of nucleobases was also evaluated (Fig. 1B). All five nucleobases were resolved on both columns, and the elution order was the same (thymine, uracil, adenine, cytosine, and guanine). Lower retention and higher efficiency (expressed as plate count) was observed with the XBridge Amide column, while comparable resolution (however, different for different pairs of analytes) resulted from both columns (Table 1). The difference in separation efficiency should also be attributed to the different particle size, i.e. 5 and 3.5 μ m for the TSK gel Amide-80 and XBridge Amide columns, respectively.

The HILIC relationship between the retention of several analytes and mobile phase strength is shown in Fig. 2. The relationship of $\log k$ versus volume fraction of water ϕ in the mobile phase is not strictly linear (similar to RP chromatography [34]). It can be fitted for both columns by Eq. (1) proposed by Schoenmakers et al. [34] (coefficients of determination $R > 0.9999$).

$$\log k = A\phi^2 + B\phi + C \quad (1)$$

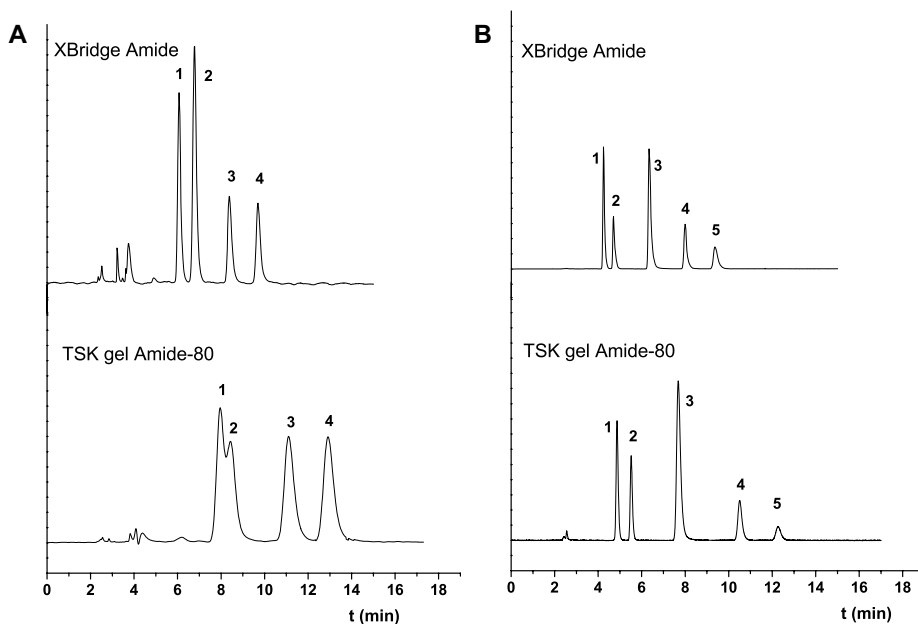


Figure 1. Chromatograms of separation of four peptides (A) and nucleobases (B) on two amide-based columns. Mobile-phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85:15 v/v, flow rate: 1 mL/min, column temperature: 25°C, UV detection: 220 nm. Elution order (A): 1: leucin enkephalinamide, 2: [D-Ala²] leucine-enkephalin, 3: leucine-enkephalin, 4: [Met⁵] enkephalin; elution order (B): 1: thymine, 2: uracil, 3: adenine, 4: cytosine, 5: guanine.

Table 1. Comparison of retention factor (k), resolution (R_S) and plate count for amide-based columns. Mobile-phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85/15 v/v

Column Compound	XBridge amide			TSK gel amide-80		
	k	R_S	Plate Count	k	R_S	Plate count
Leucin enkephalinamide	1.73		8806	2.54		
[DAla ²]-Leucine enkephalin	2.05	2.52	8004	2.77	0.96	
Leucine-enkephalin	2.77	4.94	9300	3.94	3.77	2892
[Met ⁵]Enkephalin	3.37	3.78	12 123	4.74	2.13	3471
Thymine	0.91		19 651	1.16		12 306
Uracil	1.11	3.60	19 940	1.45	3.64	14 527
Adenine	1.86	9.82	15 581	2.41	8.45	8654
Cytosine	2.60	8.06	24 246	3.67	8.36	14 620
Guanine	3.20	5.97	23 558	4.45	4.54	13 018

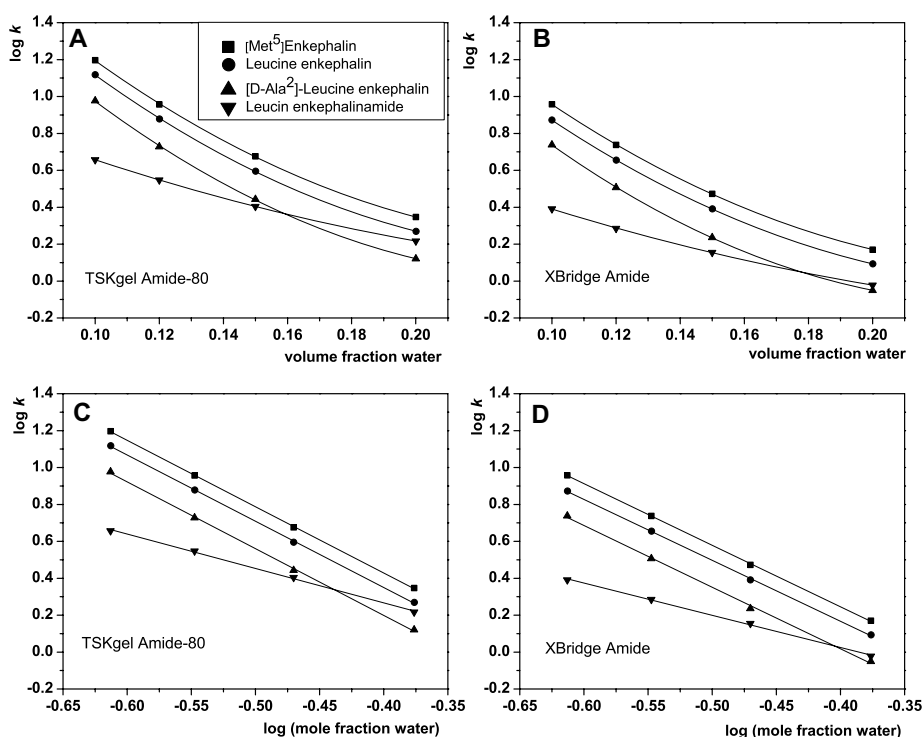
**Figure 2.** Dependency of $\log k$ of four peptides on the volume fraction of water (A, B) and on the log of the mole fraction of water (C, D) obtained for the amide-based columns. A total of 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, represents aqueous component of the mobile phase. For more details see Materials and methods section.

Figure 2 illustrates a different retention behavior for the leucin enkephalinamide, a peptide with amidated C-terminal carboxylic groups, compared to three nonamidated peptides. This observation is further discussed in Section 3.2.

The HILIC retention relationship can be linearized by converting the plot into a $\log k$ – $\log N_w$ relationship (Fig. 2C and D) using the Snyder–Soczewinski expression:

$$\log k = \log k_w - \frac{A_s}{n_w} \log N_w \quad (2)$$

where k_w is the hypothetical retention factor in purely aqueous mobile phase, A_s and n_w are the cross-sectional areas occupied by the solute molecule and the water molecules on the surface, respectively, and N_w is the mole fraction of

water in the eluent [35]. The plots in Fig. 2C and D were fitted with coefficients of determination of 0.9986–0.9998 for the XBridge Amide column and 0.9986–0.9999 for the TSK gel Amide-80 column. Similar linearity results were achieved for sets of five nonapeptides and five nucleobases (data not shown).

While both types of plots illustrate the overall retention behavior, neither one can provide a more detailed insight into the types of molecular interactions between the analytes and HILIC sorbents. In principal, Eq. (1) was used to describe partitioning and Eq. (2) adsorption LC [34, 35]. To investigate more subtle differences of the two chosen columns, we utilized additional tests, including the LFER method.

3.2 Linear free energy relationship model

Since the adsorption is an important part of the retention/separation mechanism in HILIC, the LFER method was used for the characterization and comparison of intermolecular interactions that dominate the chromatographic systems with amide-based columns and a mobile phase composed of ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85:15 v/v. The LFER model applied is based on the most generally used Eq. (3) [50]

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + \nu V \quad (3)$$

where k is solute retention factor. The independent variables are solute descriptors (see Supporting Information Table S1): E is the excess molar refraction, S is the dipolarity/polarizability, A represents the effective or overall hydrogen bond acidity, B is the effective or overall hydrogen bond basicity, and V refers to the McGowan characteristic volume [50, 51]. Regression coefficients e , s , a , b , and ν in Eq. (3) reflect the different types of molecular interactions in the separation system. In HPLC, the regression coefficients relate to the differences in the given properties of the stationary and mobile phases. The c intercept in the LFER equation is characteristic of the given system and it does not reflect any interaction; e reflects the difference in disposition of the stationary and mobile phases to interact with n - and π -electron pairs of the solutes; a and b refer to the differences in hydrogen bond basicity and hydrogen bond acidity, respectively; s is equal to the difference in dipolarity/polarizability and the coefficient ν represents the difference in dispersion interactions between the two phases [23, 24, 50–52].

The calculated LFER results are summarized in Table 2. The experimental $\log k$ values for the set of 39 test analytes show linear correlation with calculated $\log k$ values with regression fit $R = 0.96$ – 0.97 for both columns. Because we used the same mobile phase, the data can be directly used

to compare the types of interactions contributing to the retention on both amide-based sorbents. The LFER coefficient ν , expressing dispersion forces (mostly considered as hydrophobicity in RP systems) is negative and similar in both cases. It means that more hydrophobic analytes (or bigger solutes, in general) are less retained at given conditions on the amide-based HILIC SPs. The negative ν values are typical for normal phase and HILIC SPs of higher polarity than the mobile phases used.

The regression coefficients e and s are statistically insignificant in both tested systems, these interaction types do not significantly contribute to the retention. The regression coefficient a (hydrogen bond basicity) and b (hydrogen bond acidity) differ significantly on the tested columns, suggesting that the two amide sorbents provide a different degree of hydrogen bonding interactions (Table 2).

For further comparison, we plotted the experimentally measured retention factors k on the TSK gel Amide-80 and XBridge Amide columns. Fig. 3 reveals a high degree of similarity between the sorbents; this is not surprising, since both columns are based on amide chemistry. Higher retention was observed on the TSK gel Amide-80 column as could be seen from the value of the slope of linear correlation, which is less than one. The higher retention could be explained by a greater available surface on the TSK gel Amide-80 column (sorbent nominal pore size of 80 Å) compared to the XBridge Amide column (sorbent nominal pore size 130 Å). The difference of nature of the basic particles of the SPs must be also taken into account. In general, the two columns have similar selectivity; however, some solutes are relatively more retained on the XBridge Amide column (open circles in Fig. 3). Closer inspection reveals that the outliers are analytes with OH groups such as phenol (30), benzylalcohol (33), and hydroquinone (36). Similar behavior is apparent for benzonitrile (10) and benzamide (37). Interestingly, pyrocatechol (34), and resorcinol (35) with two OH groups in *ortho* and *meta* positions, respectively, are only slightly more retained on the XBridge

Table 2. Regression coefficients (statistically significant in bold) of the LFER equation and correlation coefficient R , mobile phase: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85/15 v/v

Column	Complete LFER model									
	Model	e	s	a	b	ν	c	R	n	F
XBridge amide	CM	×	×	0.068	0.466	−0.251	−0.686	0.96	39	77
	p -value	0.429	0.590	0.041	0.000	0.013	0.000			
	SE			0.032	0.033	0.095	0.064			
	±CI			0.065	0.068	0.194	0.130			
TSK gel amide-80	CM	×	×	0.126	0.586	−0.250	−0.751	0.97	39	98
	p -value	0.664	0.677	0.002	0.000	0.029	0.000			
	SE			0.037	0.038	0.109	0.073			
	±CI			0.075	0.078	0.222	0.149			

CI represents $\pm 95\%$ confidence interval; \times , insignificant difference in interaction of the solute with the mobile and stationary phases; p , statistical p -value. The p -values express the probability of the error that the individual coefficient does not contribute to the model, *i.e.* p -values represent the significance of the individual coefficients; SE is the standard error of the coefficients, F the Fisher's statistics, n the number of solutes considered in the regression.

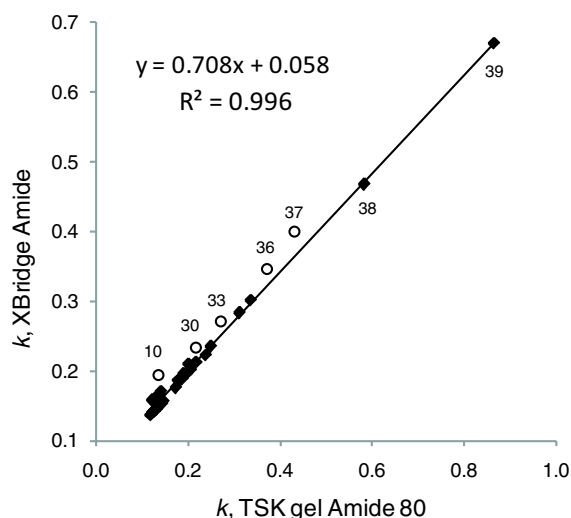


Figure 3. Correlation of retention coefficients k on the XBridge Amide column versus the TSK gel Amide-80 column. Mobile-phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85:15 v/v. Only the black diamond data series was used for the calculation of the regression trend. Selected open circle outliers labeled with numbers are compounds relatively more strongly retained on the XBridge Amide column. For chemical structures see Supporting Information Fig. S1, and for the legend for labeled analytes see Supporting Information Table S1.

Amide column (analytes are labeled in order of increasing k on the TSK gel Amide 80 column; only selected analytes are labeled in Fig. 3). The relative retention shown in Fig. 3 supports the LFER hypothesis that hydrogen bonding is linked to the apparent selectivity differences for the two investigated columns.

The results (combined with LFER regression values, Table 2) indicate that the TSK gel Amide-80 column can provide slightly higher retention of analytes interacting through hydrogen bonds. This is in good agreement with the results obtained for peptides, nucleobases (Fig. 1), and small molecules (Fig. 3).

While several authors reported that ionic interactions play a role in HILIC retention on evaluated amide columns [52,53], LFER cannot confirm this since Eq. (1) does not include a term representing ionic interactions. While LFER equation can be extended to include the effect of ionic interactions [19], we decided to investigate the potential ionic interaction using an alternative approach described in Section 3.4.

3.3 Group selectivity tests and other characteristics

Several additional tests performed in the HILIC mode are summarized in Table 3. The selectivity for a methylene group, α (CH_2), can be calculated as k (uridine)/ k (5-methyluridine). This selectivity test offers information on the degree of hydrophobic interactions between the SP and the test compounds [30]. Similarly, the selectivity caused by the hy-

Table 3. Retention factors and selectivities of tested compounds on two amide-based columns, mobile phase: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85/15 v/v

Column Compound	XBridge amide		TSK gel amide-80	
	k	α	k	α
L-tryptophan	3.94		5.63	
N-Boc-L-tryptophan	0.47	8.38	0.50	11.26
D-phenylalanine	4.06		5.85	
N-Boc-D-phenylalanine	0.45	9.02	0.48	12.19
L-tyrosine	6.87	9.81	10.28	13.35
N-Boc-L-tyrosine	0.70		0.77	
Uridine	2.07		2.78	
5-Methyluridine	1.66	1.25	2.19	1.27
2'-Deoxyuridine	1.38	1.50	1.81	1.54

$\alpha = k$ (amino acid)/ k (Boc analog).

$\alpha = k$ (uridine)/ k (5-methyluridine).

$\alpha = k$ (uridine)/ k (2'-deoxyuridine).

droxy group, α (OH), can be obtained as k (uridine)/ k (2'-deoxyuridine) [30]. According to these tests the both columns showed similar selectivities (see Table 3).

A set of amino acids and their Boc-protected (Boc bonded to the NH_2 group of amino acid) analogs were chosen to describe the selectivity of the NH_2 group, expressed as $\alpha(\text{NH}_2) = k$ (amino acid)/ k (Boc-amino acid). Retention factors and selectivities obtained for both columns are summarized in Table 3. Generally, the unprotected amino acids were substantially more retained than their Boc-protected analogs that had very low k values. The derivatization of NH_2 group reduces/eliminates its ability to participate in the cationic and H-bonding interactions, which may substantially contribute to retention. The observed NH_2 selectivity differences between the selected columns indicate that at a given pH some ionic interactions may participate in the retention mechanism, more strongly on the TSK gel Amide-80 column. This result is in good agreement with the higher positive value of the LFER regression coefficient b (hydrogen bond acidity) obtained on this column.

3.4 Basic compounds

The approach used for the characterization of ionic interactions participating in the RP retention mechanism [36] was adapted to HILIC systems. Because the hydrophobicity (ν values) obtained from the LFER study was equal for the both columns, we focused on basic compounds, which are sensitive indicators of ionic interactions [36]. We selected molecules with different dissociation constants, expressed as $\text{p}K_a$, i.e. fully ionized ($\text{p}K_a > 9.5$) or partially ionized ($\text{p}K_a \sim 4.6$) at the given buffer pH of 4.00 (Table 4).

Table 4 shows that selectivity measured as ratio of the retention factors for the two charged and partially charged compounds is similar for both columns. In other words, if

Table 4. Properties of the tested basic compounds, their retention factors k and selectivity α on two amide-based columns, mobile phase: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85/15 v/v

Column Compound		$pK_a^a)$	XBridge k	Amide 80 k	XBridge α	Amide 80 α	XBridge α	Amide 80 α
A	<i>N</i> -Benzylmethylamine	9.52	1.70	3.03	$k_A/k_B = 1.07$	$k_A/k_B = 1.10$	$k_A/k_C = 5.31$	$k_A/k_C = 9.18$
B	2-Phenylethylamine	9.81	1.59	2.74			$k_A/k_D = 7.39$	$k_A/k_D = 13.17$
C	Quinoline	4.64	0.32	0.33	$k_C/k_D = 1.39$	$k_C/k_D = 1.43$	$k_B/k_C = 4.97$	$k_B/k_C = 8.30$
D	Aniline	4.58	0.23	0.23			$k_B/k_D = 6.91$	$k_B/k_D = 11.91$

a) pK_a values of protonated forms in aqueous solution at 25°C, computed with software package PALLAS for prediction of pK_a constants [40].

there is some ionic interaction, it equally affects the retention of similarly charged analytes on both columns. The situation changes dramatically when we calculate the selectivity for differently charged compounds, i.e. k of charged versus k of partially charged (Table 4). Such selectivity factors are quite different for the investigated HILIC columns. It appears that fully charged analytes are relatively more strongly retained on the TSK Amide 80 column compared to the XBridge Amide column. We conclude that the TSK Amide-80 column provides a more significant cation-exchange type of interaction compared to the XBridge Amide column.

3.5 Effect of temperature

Column temperature is an important factor affecting retention, selectivity, and resolution in HPLC separations, in general [13, 54]. The effect of temperature was tested in the range of 10–40°C (preferred temperature range on silica-based columns) in 5°C increments for the nucleobases, uridine and its derivatives. All analytes showed a small decrease of retention upon increasing column temperature. The average shift of retention factors between 10 and 40°C corresponded to retention time difference of 1–2 min.

Van't Hoff plots of $\ln k$ versus $1/T$ showed linearity with correlation coefficients equal or higher than 0.99 (Fig. 4). The linear dependences confirm no change of retention mechanism in the measured temperature range. The obtained thermodynamic parameters, results for uridine and its derivatives

and nucleobases, are summarized in Table 5. Standard enthalpies (ΔH°) calculated from the van't Hoff equations were negative for all analytes in both separation systems tested. Similar results were obtained for salicylic acid, aspirin, and cytosine on the TSK Amide-80 column in the work by Guo and Gaiki [16]. No significant differences between the columns were observed. From a thermodynamic point of view, both amide-based columns are similar.

4 Concluding remarks

Since many columns are available on the market, the question often arises of how to select an appropriate SP for a given separation. Various characterization approaches offer mostly just partial information of the SP properties. In this paper, we used various methods and tests to describe and compare two amide-based columns in HILIC mode. Selectivity tests for different groups ($-\text{CH}_2-$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$), comparison of behavior of sets of compounds of similar structure, and LFER and van't Hoff dependences revealed some differences between the SPs. Not surprisingly, since the columns are based on amide chemistry, the LFER model detected a similar apparent hydrophobicity. Group selectivity testing and elevated values of LFER b and a regression coefficients indicate a greater degree of hydrogen bonding interactions, namely, H-bond acidity and basicity, on the TSK gel Amide-80 column. The higher absolute and relative retention of basic compounds

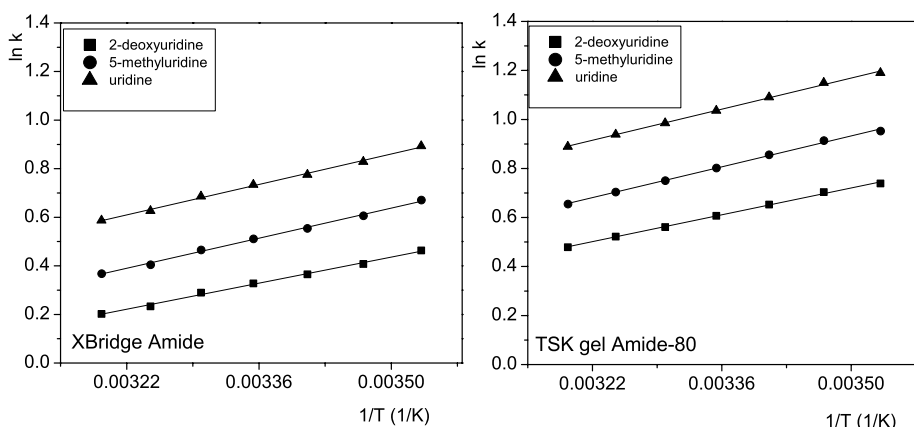


Figure 4. Plots of $\ln k$ versus $1/T$ for uridine and its derivatives for two amide-based columns. Mobile phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85/15 v/v. Column temperature was varied from 10–40°C (increment of 5°C).

Table 5. Thermodynamic parameters ΔH° , ΔS° calculated from equation $\ln k = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R + \ln \varphi$, correlation coefficient R^2 of uridine and its derivatives and nucleobases

Analyte	Column	$-\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$-\Delta S^\circ$ (J/mol K)	R^2
2-Deoxyuridine	XBridge amide	6.37	18.7	0.997
	TSK gel amide-80	6.50	16.8	0.998
5-Methyluridine	XBridge amide	7.37	20.5	0.998
	TSK gel amide-80	7.48	18.4	0.998
Uridine	XBridge amide	7.45	18.9	0.998
	TSK gel amide-80	7.54	16.7	0.998
Thymine	XBridge amide	4.77	16.7	0.990
	TSK gel amide-80	4.73	14.5	0.990
Uracil	XBridge amide	4.94	15.6	0.991
	TSK gel amide-80	5.22	14.3	0.997
Adenine	XBridge amide	7.00	18.3	0.998
	TSK gel amide-80	7.05	16.2	0.998
Cytosine	XBridge amide	7.19	16.1	0.997
	TSK gel amide-80	7.14	12.9	0.999
Guanine	XBridge amide	4.53	5.5	0.997
	TSK gel amide-80	4.47	2.4	0.995

Mobile phase: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85/15 v/v, R^2 correlation coefficient of van't Hoff plot.

$$\Delta S^\circ = \Delta S^\circ + R \ln \varphi.$$

indicates a moderately higher cation-exchange activity on the TSK gel Amide-80 column. The higher retention of the TSK gel Amide-80 column can be also attributed to the greater available SP surface. Nevertheless, better selectivity for pentapeptides was achieved with the XBridge column. Van't Hoff plots show that the effect of temperature in the studied range is not essential on the amide-based columns in HILIC mode. In summary, the two investigated columns provide highly similar although not identical physicochemical interactions with test analytes.

We gratefully acknowledge financial support of the KONTAKT AM 2010 project LH11018, project UNCE 204018/304018/2012, SVV 267215, and the long-term research plan of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic, MSM 0021620857.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Gama, M. R., Silva, R. G. C., Colins, C. H., Bottoli, C. B. G., *Trends Anal. Chem.* 2012, 37, 48–60.
- [2] Dousa, M., Brichac, J., Svoboda, J., Klvana, R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 66, 359–364.
- [3] Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K., Tanaka, N., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 474–503.
- [4] Strege, M. A., *Anal. Chem.* 1998, 70, 2439–2445.
- [5] Buszewski, B., Noga, S., *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402, 231–247.
- [6] Alpert, J. A., *J. Chromatogr. A* 1990, 499, 177–196.
- [7] Linden, J. C., Lawhead, C. L., *J. Chromatogr.* 1975, 105, 125–133.
- [8] Palmer, J. K., *Anal. Lett.* 1975, 8, 215–224.
- [9] Verhaar, L. A. T., Kuster, B. F. M., *J. Chromatogr.* 1982, 234, 57–64.
- [10] Orth, P., Engelhardt, H., *Chromatographia* 1982, 15, 91–96.
- [11] Wang, Ch., Jiang, Ch., Armstrong, D. W., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1980–1990.
- [12] Buszewski, B., Bocian, S., Dziubakiewicz, E., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1529–1537.
- [13] Hemstrom, P., Irgum, K., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1784–1821.
- [14] Kirkland, J. J., Dilks, C. H., Destefano, J. J., *J. Chromatogr.* 1993, 635, 19–30.
- [15] Chauve, B., Guillarme, D., Cleon, P., Veuthey, J. L., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 752–764.
- [16] Guo, Y., Gaiki, S., *J. Chromatogr. A* 2005, 1074, 71–80.
- [17] Yoshida, T., Okada, T., *J. Chromatogr. A* 1999, 840, 1–9.
- [18] Jandera, P., Hajek, T., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 3603–3619.
- [19] Chirita, R., West, C., Zubrzycki, S., Finaru, A., Elfakir, C., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 5939–5963.
- [20] Armstrong, D. W., Jin, H. L., *J. Chromatogr.* 1989, 462, 219–232.
- [21] Qiu, H., Loukotkova, L., Sun, P., Tesarova, E., Bosakova, Z., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 270–279.
- [22] Kozlik, P., Simova, V., Kalikova, K., Bosakova, Z., Armstrong, D. W., Tesarova, E., *J. Chromatogr. A* 2012, 1257, 58–65.
- [23] Janeckova, L., Kalikova, K., Vozka, J., Armstrong, D. W., Bosakova, Z., Tesarova, E., *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 2639–2644.
- [24] Kalikova, K., Janeckova, L., Armstrong, D. W., Tesarova, E., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 1393–1398.

- [25] Claessens, H. A., *Trends Analyt. Chem.* 2001, 20, 563–583.
- [26] Walters, M. J., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1987, 70, 465–469.
- [27] Engelhardt, H., Jungheim, M., *Chromatographia* 1990, 29, 59–68.
- [28] Kimata, K., Iwaguchi, K., Onishi, S., Jinno, K., Eksteen, R., Hosoya, K., Araki, M., Tanaka, N., *J. Chromatogr. Sci.* 1989, 27, 721–728.
- [29] Galushko, S. V., *Chromatographia* 1993, 36, 39–42.
- [30] Kawachi, Y., Ikegami, T., Tabuko, H., Ikegami, Y., Miyamoto, M., Tanaka, N., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 5903–5919.
- [31] Tesarova, E., Bosakova, Z., Pacakova, V., *J. Chromatogr. A* 1999, 838, 121–129.
- [32] Tesarova, E., Bosakova, Z., Zuskova, I., *J. Chromatogr. A* 2000, 879, 147–156.
- [33] Janeckova, L., Kalikova, K., Bosakova, Z., Tesarova, E., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 3043–3051.
- [34] Schoenmakers, P. J., Billiet, H. A. H., De Galan, L., *J. Chromatogr.* 1979, 185, 179–195.
- [35] Snyder, L. R., Poppe, H., *J. Chromatogr.* 1980, 184, 363–413.
- [36] Sykora, D., Tesarova, E., Popl, M., *J. Chromatogr. A* 1997, 758, 37–51.
- [37] Hao, Z., Xiao, B., Weng, N., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1449–1464.
- [38] Dolan, J. W., *J. Chromatogr. A* 2002, 965, 195–205.
- [39] Karlsson, G., Winge, S., Sandberg, H., *J. Chromatogr. A* 2005, 1092, 246–249.
- [40] McCalley, D. V., *J. Chromatogr. A* 2000, 902, 311–321.
- [41] Vitha, M., Carr, P. W., *J. Chromatogr. A* 2006, 1126, 143–194.
- [42] Poole, C. F., Poole, S. K., *J. Chromatogr. A* 2002, 965, 263–299.
- [43] Kamlet, M. J., Taft, R. W., *J. Am. Chem. Soc.* 1976, 98, 377–383.
- [44] Sandi, A., Nagi, M., Szepeszy, L., *J. Chromatogr. A* 2000, 893, 215–234.
- [45] Studzinska, S., Buszewski, B., *Chromatographia* 2012, 75, 1235–1246.
- [46] Jandera, P., Hajek, T., Skerikova, V., Soukup, J., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 841–852.
- [47] Schuster, G., Lindner, W., *J. Chromatogr. A* 2013, 1273, 73–94.
- [48] Abraham, M. H., *Chem. Soc. Rev.* 1993, 22, 73–83.
- [49] Abraham, M. H., Haftvan, J. A., Whiting, G. S., Leo, A., Taft, R. S., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1994, 8, 1777–1791.
- [50] Abraham, M. H., Whiting, G. S., Doherty, R. M., Shuely, W., *J. Chromatogr.* 1991, 587, 213–228.
- [51] Abraham, M. H., McGowan, J., *Chromatographia* 1987, 23, 243–246.
- [52] Ahn, J., Bones, J., Yu, Y. Q., Rudd, P. M., Gilar, M., *J. Chromatogr. B* 2010, 878, 403–408.
- [53] Karlsson, G., Swerup, E., Sandberg, H., *J. Chromatogr. Sci.* 2008, 46, 68–73.
- [54] Bicker, W., Wu, J. Y., Lammerhofer M., Lindner W., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 2971–2987.

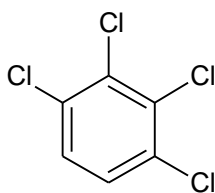
Supporting information

Table S1: Set of test analytes with their solvation parameters and obtained retention factors

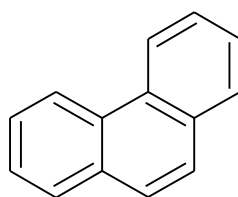
Number	Analyte	E	S	A	B	V	k^*	k^{**}
1	Tetrachlorobenzene	1.180	0.920	0.000	0.000	1.206	0.120	0.137
2	Phenanthrene	2.055	1.290	0.000	0.260	1.454	0.122	0.158
3	Pyrene	2.810	1.710	0.000	0.290	1.585	0.122	0.141
4	Dibenzothiophene	1.959	1.310	0.000	0.180	1.379	0.124	0.142
5	1,3-Xylene	0.623	0.520	0.000	0.160	0.998	0.129	0.143
6	1,4-Xylene	0.613	0.520	0.000	0.160	0.998	0.129	0.143
7	1,2,3-Trichlorobenzene	1.030	0.860	0.000	0.000	1.084	0.131	0.157
8	1,2-Xylene	0.663	0.560	0.000	0.160	0.998	0.132	0.148
9	Naphthalene	1.340	0.920	0.000	0.200	1.085	0.135	0.151
10	Benzonitrile	0.742	1.110	0.000	0.330	0.871	0.136	0.195
11	Benzophenone	1.447	1.500	0.000	0.500	1.481	0.136	0.153
12	1,2-Dichlorobenzene	0.872	0.780	0.000	0.040	0.961	0.137	0.166
13	Benzene	0.610	0.520	0.000	0.140	0.716	0.138	0.167
14	Toluene	0.600	0.520	0.000	0.140	0.857	0.140	0.172
15	3-Nitrotoluene	0.874	1.100	0.000	0.250	1.032	0.143	0.155
16	Bromobenzene	0.882	0.730	0.000	0.090	0.891	0.143	0.157
17	Chlorobenzene	0.718	0.650	0.000	0.070	0.839	0.143	0.152
18	2-Nitrotoluene	0.866	1.110	0.000	0.270	1.032	0.145	0.157
19	2-Nitrophenol	1.015	1.050	0.050	0.370	0.949	0.173	0.176
20	2-Naphthol	1.520	1.080	0.610	0.400	1.144	0.180	0.188
21	3-Chlorophenol	0.909	1.060	0.690	0.150	0.898	0.183	0.186
22	4-Chlorophenol	0.915	1.080	0.670	0.210	0.898	0.188	0.188
23	1,2-Cresol	0.840	0.860	0.520	0.310	0.916	0.190	0.195
24	2-Chlorophenol	0.853	0.880	0.320	0.310	0.898	0.191	0.193
25	1,2-Toluidine	0.966	0.920	0.230	0.450	0.957	0.197	0.196
26	1,3-Cresol	0.822	0.880	0.570	0.340	0.916	0.198	0.198
27	Ethyl acetate	0.106	0.620	0.000	0.450	0.747	0.200	0.211
28	4-Nitrophenol	1.070	1.720	0.820	0.260	0.949	0.205	0.202
29	1,4-Toluidine	0.923	0.950	0.230	0.450	0.957	0.218	0.211
30	Phenol	0.805	0.890	0.600	0.300	0.775	0.218	0.234
31	Aniline	0.955	0.960	0.260	0.410	0.816	0.239	0.224
32	3-Hydroxybenzaldehyde	0.990	1.380	0.740	0.400	0.932	0.249	0.235
33	Benzylalcohol	0.803	0.870	0.330	0.560	0.916	0.270	0.272
34	Pyrocatechol	0.970	1.070	0.850	0.520	0.834	0.312	0.283
35	Resorcinol	0.980	1.000	1.100	0.580	0.834	0.336	0.302
36	Hydroquinone	1.000	1.000	1.160	0.600	0.834	0.370	0.347
37	Benzamide	0.990	1.500	0.490	0.670	0.973	0.432	0.400
38	Caffeine	1.500	1.600	0.000	1.330	1.364	0.583	0.468
39	Theophylline	1.500	1.600	0.540	1.340	1.222	0.864	0.671

k^* retention factors obtained for TSK gel Amide-80 column; k^{**} retention factors obtained for XBridge Amide column

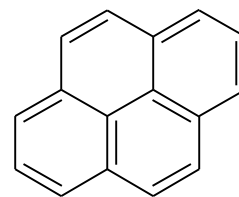
Structures of analytes used for LFER method



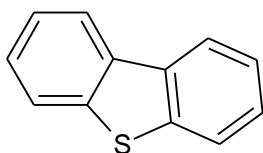
1,2,3,4-tetrachlorobenzene (1)



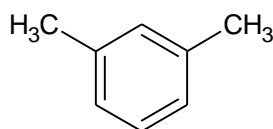
phenanthrene (2)



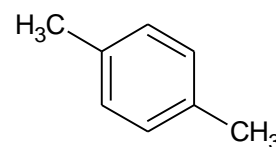
pyrene (3)



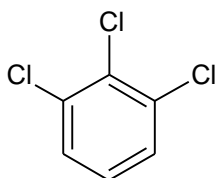
dibenzothiophene (4)



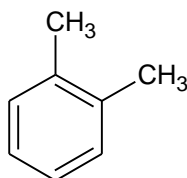
1,3-xylene (5)



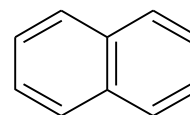
1,4-xylene (6)



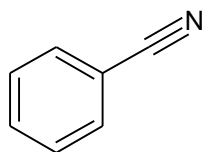
1,2,3-trichlorobenzene (7)



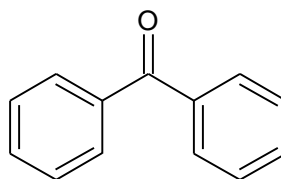
1,2-xylene (8)



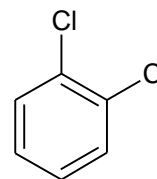
naphthalene (9)



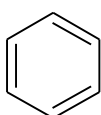
benzonitrile (10)



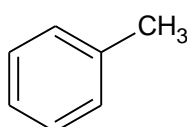
benzophenone (11)



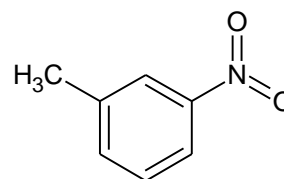
1,2-dichlorobenzene (12)



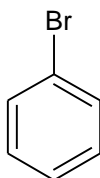
benzene (13)



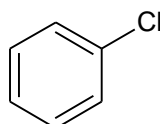
toluene (14)



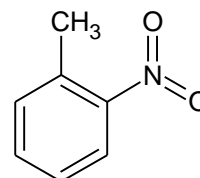
3-nitrotoluene (15)



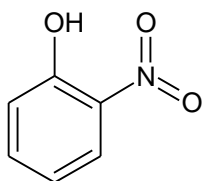
bromobenzene (16)



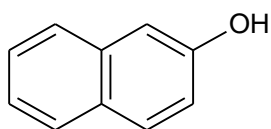
chlorobenzene (17)



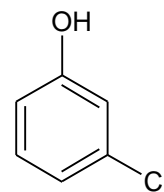
2-nitrotoluene (18)



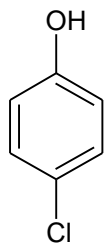
2-nitrophenol (19)



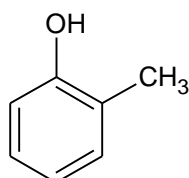
2-naphthol (20)



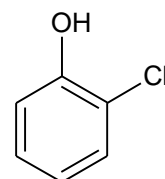
3-chlorophenol (21)



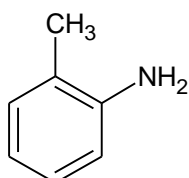
4-chlorophenol (22)



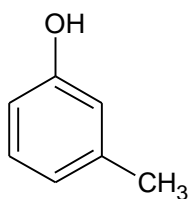
1,2-cresol (23)



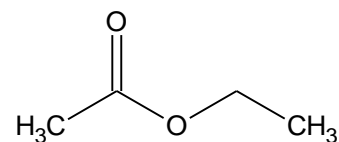
2-chlorophenol (24)



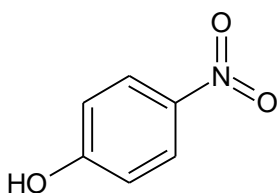
1,2-toluidine (25)



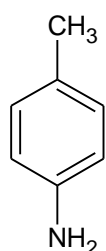
1,3-cresol (26)



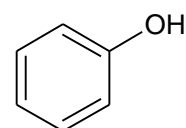
ethyl acetate (27)



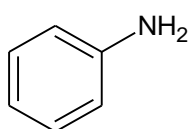
4-nitrophenol (28)



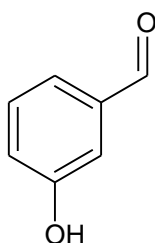
1,4-toluidine (29)



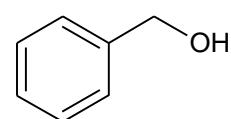
phenol (30)



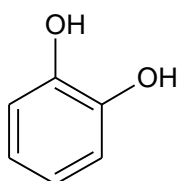
aniline (31)



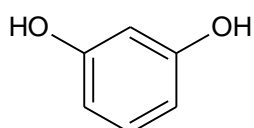
3-hydroxybenzaldehyde (32)



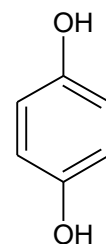
benzylalcohol (33)



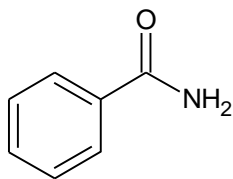
pyrocatechol (34)



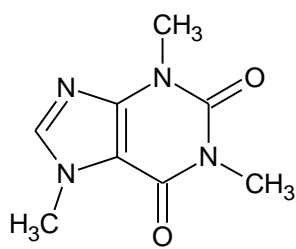
resorcinol (35)



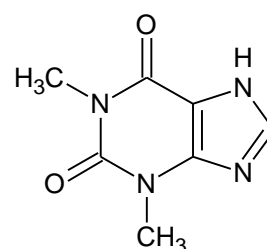
hydroquinone (36)



benzamide (37)

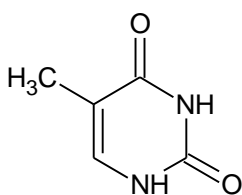


caffeine (38)

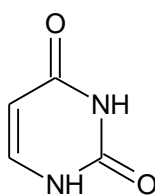


theophylline (39)

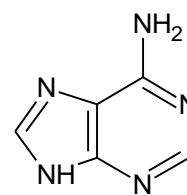
Structures of other analytes



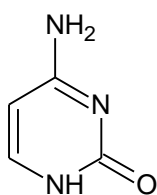
thymine



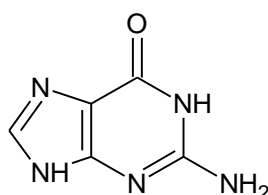
uracil



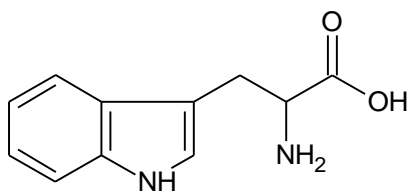
adenine



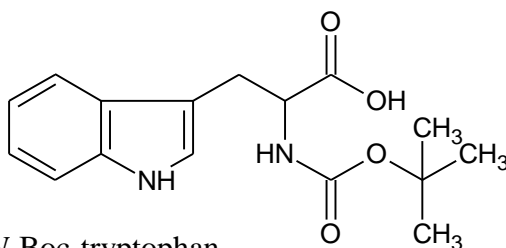
cytosine



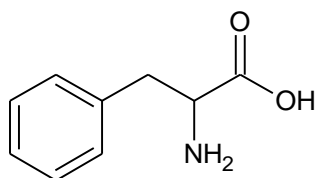
guanine



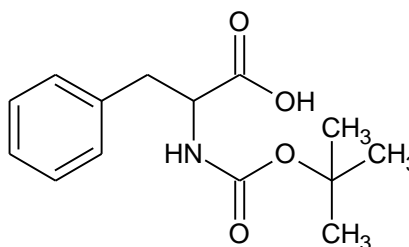
tryptophan



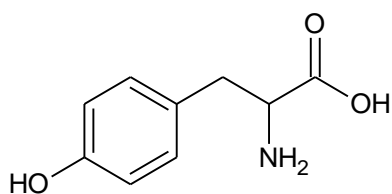
N-Boc-tryptophan



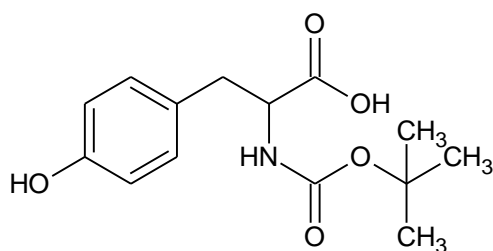
phenylalanine



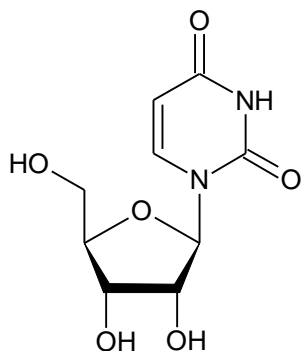
N-Boc-phenylalanine



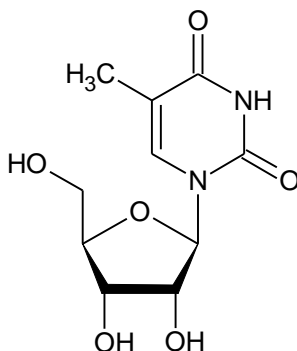
tyrosine



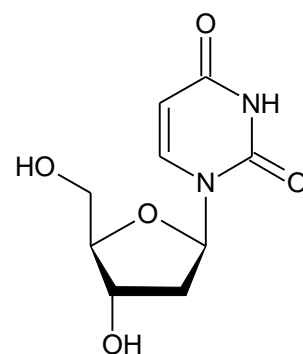
N-Boc-tyrosine



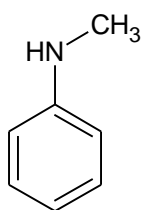
uridine



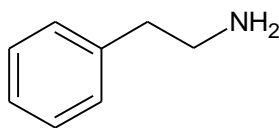
5-methyluridine



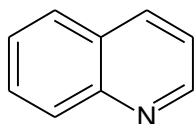
2'-deoxyuridine



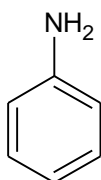
N-benzylmethylamine



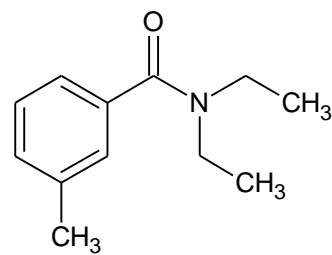
2-phenylethylamine



quinoline



aniline



N,N-diethyl-*m*-toluamide

Leucine enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)

Leucine enkephalinamide (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH₂)

[Met⁵]Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met)

[D-Ala²]-Leucine enkephalin (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu)

Fig. S1. Structures of tested analytes.

PUBLIKACE IV

**HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS
SPECTROMETRIC DETECTION APPLIED FOR ANALYSIS OF PTERIDINES IN TWO
GRAPHOSOMA SPECIES (INSECTA: HETEROPTERA)**

Kozlík, P.; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.;
Bosáková, Z.

J. Chromatogr. B 930 (2013) 82-89.



Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection applied for analysis of pteridines in two *Graphosoma* species (Insecta: Heteroptera)

Petr Kozlík^a, Jan Krajíček^a, Květa Kalíková^b, Eva Tesařová^b, Radomír Čabala^a, Alice Exnerová^c, Pavel Štys^c, Zuzana Bosáková^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

^b Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

^c Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2013

Accepted 2 May 2013

Available online 9 May 2013

Keywords:

Hydrophilic interaction liquid chromatography
Tandem mass spectrometry
Pteridines
Graphosoma
Insecta
Heteroptera

ABSTRACT

A new separation method involving hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometric detection has been developed for the analysis of pteridines, namely biopterin, isoxanthopterin, leucopterin, neopterin, xanthopterin and erythropterin in the cuticle of heteropteran insect species. Two columns, Atlantis HILIC Silica and ZIC®-HILIC were tested for the separation of these pteridines. The effect of organic modifier content, buffer type, concentration and pH in mobile phase on retention and separation behavior of the selected pteridines was studied and the separation mechanism was also investigated. The optimized conditions for the separation of pteridines consisted of ZIC®-HILIC column, mobile phase composed of acetonitrile/5 mM ammonium acetate, pH 6.80, 85/15 (v/v), flow rate 0.5 mL/min and column temperature 30 °C. Detection was performed by tandem mass spectrometry operating in electrospray ionization with Agilent Jet Stream technology using the selected reaction monitoring mode. The optimized method provided a linearity range from 0.3 to 5000 ng/mL ($r > 0.9975$) and repeatability with relative standard deviation < 8.09% for all the studied pteridines. The method was applied to the analysis of pteridines in the cuticle of larvae and three adult color forms of *Graphosoma lineatum* and one form of *Graphosoma semipunctatum* (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). The analysis shows that different forms of *Graphosoma* species can be characterized by different distribution of individual pteridines, which affects the coloration of various forms. Only isoxanthopterin was found in all the five forms tested.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pteridines belong to a group of compounds widely distributed in organisms, being present in Prokaryota as well as in Eukaryota (protists, plants, fungi and animals) [1]. Pteridines and their derivatives have several important biological functions. They are important compounds in the process of cell metabolism, such as hydroxylation reactions, conversion of tyrosine into 3,4-dihydroxyphenylalanine, precursor of melanin and play a role in cellular electron transport etc. [1–5]. The increased urinary excretion of these compounds has been found to indicate several disorders, for example viral infections [6] or different types of

cancer [7–10]. Pteridines are also one of the families of pigmentary colors of insect cuticle, and some of them are also important eye pigments [11]. They have various colors (structure based), ranging from white (leucopterin), or yellow (xanthopterin) over red (erythropterin) to fluorescent blue under ultraviolet light (biopterin) [12]. Pigmentation caused by pteridines often serves as protective coloration which may be roughly divided into aposematic (warning) and cryptic (part of camouflage) colorations [13–15].

In this paper, pigmentary colors caused by pteridines in two species of heteropteran insects (true bugs) were studied. The pigments of both the species studied, *Graphosoma lineatum* and *Graphosoma semipunctatum* (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae), are formed in the epithelial part of the integument and deposited in the cuticle. The color patterns on the body of the *Graphosoma* species are formed by pigmentose pteridine ground-coloration (ranging from yellow to beige, red and brown) with overlaid longitudinal black stripes and spots formed by black melanin. It has been known for years that the hue of the ground

* Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 2030, 128 43 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 221951231; fax: +420 224 913 538.

E-mail address: bosakova@natur.cuni.cz (Z. Bosáková).

color of West Palaearctic *Graphosoma* species varies. However, only recently has the seasonality of one of the northernmost population of *G. lineatum* (Sweden: Stockholm area) been investigated: the larvae are brown, metamorphosed pre-hibernating adults are pale (beige), over winter and emerge in spring as vividly red post-hibernating individuals. Similar, not so regular and less contrasting changes also occur in its Central European populations while the situation in the Mediterranean populations and in the closely related *G. semipunctatum* is more complex and possibly more area-dependent [15]. To complete the color picture and the pteridine array we have additionally included in our study yellow *G. lineatum* from Sardinia (post-hibernating population) and orange post-hibernating individuals of *G. semipunctatum* from the island of Zakynthos (Greece). Henceforth, all five samples examined will be called “forms” for simplicity.

Analysis of pteridines is a difficult task because of their physicochemical characteristics, mainly sensitivity to light resulting in their degradation, the possibility of diverse oxidation products, low solubility and very low concentrations in biological materials [16]. The most widely applied technique for their analysis is high performance liquid chromatography (HPLC) usually coupled with fluorescence detection [7,10,17–22]. HPLC methods typically use reversed phase (RP) mode often employing almost 100% aqueous mobile phases. These mobile phases can generate non-reproducible retention times and reduce the lifetime of analytical columns [23–25]. Due to solving these difficulties in the separating of pteridines hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) was tested. However, only two papers on HILIC analysis of pteridines have been published to date [23,26]. Retention properties of ultra-HPLC hybrid stationary phases have been studied for the group of polar basic pteridines (neopterin, biopterin, dihydroneopterin and dihydrobiopterin) in HILIC with fluorescence and mass spectrometric detections [23]. HILIC coupled with fluorescence detection has been applied to the analysis of neopterin, biopterin and isoxanthopterin in urine samples [26]. Another method employed for the determination of pteridines was capillary electrophoresis (CE) [27,28,8,29,30]. Most of these cited papers are focused on the analysis of pteridines as cancer markers in humans. The reported analyses of pteridines in insect cuticles have been performed mainly by paper chromatography and/or by thin layer chromatography [1,12,31–37] and especially by HPLC [38]. According to Nemec et al. [12] the pigment pattern in the studied insect (locust), particularly with respect to pteridine-like molecules, is much more complex than it has been reported in previous publications and the identification of pteridine-like pigments would require more sophisticated methods, namely HPLC coupled with mass spectrometry [12].

As mentioned above, HILIC, which is profitable for the analysis of polar compounds especially in proteomics, glycomics and clinical analysis [39–41], could be a good alternative to RP HPLC for the analysis of pteridines. In HILIC mode the analytes interact with the hydrophilic stationary phase and the elution is generated by hydrophobic binary mobile phase containing water as a strong eluting solvent. The suggested mechanism in HILIC involves partitioning the hydrophobic mobile phase and a layer of mobile phase enriched with the aqueous part being partially immobilized on the surface of stationary phase [42]. However, the retention mechanism in HILIC does not seem to be completely clear. Hydrogen bonding is supposed to play an important role in this process [43]. It may also include ionic, dispersion and hydrophilic interactions [43–52].

The aim of this work was to develop a new LC–MS/MS method applicable for identification and quantitation of selected pteridines (biopterin, isoxanthopterin, leucopterin, neopterin, xanthopterin and erythropterin, for their structures, see Fig. 1), which can be present in integuments of *G. lineatum* and *G. semipunctatum*. The

analysis of integuments from individual morphological forms should provide a relative distribution of pteridines, which is assumed to be responsible for the color variation of heteropteran insects. Due to the polar character of pteridines HILIC combined with high sensitivity tandem mass spectrometric detection was used. The method development process also contributed to a better understanding of HILIC separation. To the best of our knowledge (according to the literature) the application of HILIC with MS/MS detection for analysis of pteridines in insects has not been used yet.

2. Experimental

2.1. Chemicals, reagents and real samples

Acetonitrile (ACN, gradient grade), ammonium acetate (purity $\geq 99\%$), acetic acid (purity $>99.8\%$), formic acid (purity $>98\%$) and dimethyl sulfoxide (purity $>99.9\%$) were supplied by Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Ammonium hydroxide (solution 25%) was obtained from Lachner (Neratovice, Czech Republic). The deionized water used was purified with a Milli-Q water purification system from Millipore (Bedford, USA). Standards of pteridines, namely biopterin, isoxanthopterin, leucopterin, neopterin and xanthopterin, were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA), and erythropterin was provided by Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Germany).

Stock solutions of the individual standards were prepared at a concentration of 0.1 mg/mL by dissolving the compounds in dimethyl sulfoxide. Stock solutions were kept in the dark at 4 °C. The stock solutions were further diluted by acetonitrile to attain the required concentrations.

Real samples consisted of 5th (last) instar larvae (Stockholm, Sweden), pale pre-hibernating adults (Stockholm, Sweden), red post-hibernating adults (Stockholm, Sweden), yellow post-hibernating adults (Sardinia, Italy) of *G. lineatum*, and orange post-hibernating adults of *G. semipunctatum* (Zakynthos Is., Greece).

2.2. Instrumentation

All chromatographic measurements were carried out on a HPLC system Agilent HPLC series 1200 coupled with a Triple Quad 6460 tandem mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) consisting of an automated injector, a column oven, a degasser and a quaternary pump. For data acquisition, the Mass Hunter Workstation software was used. Two columns were tested: Atlantis HILIC Silica (4.6 mm \times 150 mm, 3 μ m), based on silica gel, from Waters (Milford, USA) and ZIC®-HILIC (4.6 mm \times 150 mm, 3.5 μ m), based on zwitterionic sulfobetaine groups, from Merck (Darmstadt, Germany).

The temperature of the columns was kept at 30 °C and samples were thermostated at 20 °C. The injection volume was 5 μ L and the flow rate of mobile phase was 0.5 mL/min. The MS/MS measurements were performed in the selected reaction monitoring mode (positive and negative mode were switched every 30 ms in one run) using electrospray ionization with Agilent Jet Stream technology (AJS). AJS with thermal gradient technology uses super-heated nitrogen as a sheath gas to improve ion production and desolvation. Nitrogen was used as the collision, nebulizing and desolvating gas.

2.3. Chromatographic conditions

Ammonium acetate or ammonium formate buffers were prepared by dissolving the appropriate amounts of ammonium acetate or ammonium formate in deionized water and adjusted with acetic acid or formic acid or ammonium hydroxide to the required pH value.

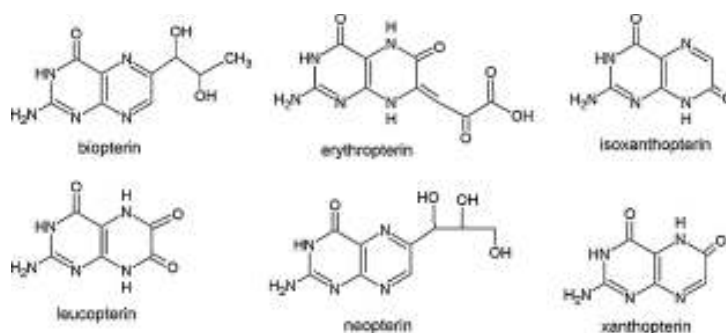


Fig. 1. Chemical structures of the pteridines studied.

The effect of the ratio of organic solvent to water content in the mobile phase and the influence of additive type (acetic acid, formic acid, ammonium acetate, ammonium formate), its pH and concentration on retention of pteridines were investigated. The effect of pH was tested in the range of 4–6 pH units for Atlantis HILIC Silica column and within 4–8 pH units for ZIC®-HILIC column (pH was varied in steps of 0.5 unit for both columns). The effect of buffer concentrations was tested in the range of 1–25 mM for both columns (buffer concentrations were varied in steps of 5 mM).

The retention times of all analytes were measured in triplicate. The retention was expressed as retention factor (*k*).

2.4. Sample preparation of *G. lineatum* and *G. semipunctatum*

The insect integuments were extracted by dimethyl sulfoxide. The extraction time was optimized to achieve the equilibrium concentration of pteridines by monitoring the pteridine extract during one week. An appropriate amount of dry insect integuments ranging from 2.5 to 6.5 mg was crushed, homogenized and extracted in 2 mL of dimethyl sulfoxide. Then the sample was centrifuged for 10 minutes at $11,337 \times g$, the supernatant was collected and diluted 1:100 with acetonitrile. Four forms of *G. lineatum* (larvae, pale, red and yellow adults) and one form of *G. semipunctatum* (orange adults) were analyzed.

2.5. Validation of the method

The method was validated for linearity, limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ), accuracy, precision, carry-over effect and matrix effects. Linearity was established using standard solutions of pteridines serially diluted by acetonitrile within the range of 0.1–2500 ng/mL for biopterin (the calibration concentrations were 0.1, 1, 5, 25, 125, 625, 1250, 2500 ng/mL) and 1–5000 ng/mL for other pteridines (the calibration concentrations were 1, 5, 25, 125, 625, 1250, 2500, 5000 ng/mL), which reflected the expected concentrations of analytes in the real samples. The accuracy of the method was evaluated by analysis of quality control (QC) samples at low (10 ng/mL for biopterin and 20 ng/mL for others pteridines), medium (1 µg/mL for biopterin and 2.5 µg/mL for others pteridines) and high (2.5 µg/mL for biopterin and 5 µg/mL for others pteridines) concentration levels. The agreement between the theoretical and measured values was confronted. The precision was established by replicate analysis of QC samples at the same concentrations as for accuracy measurements.

Method selectivity was monitored by the injection of the sample of *G. lineatum* (mass spectrometer was set in scan mode) and the carry-over effect was checked by the injection of a blank sample (consisting of 1/99 (v/v) dimethyl sulfoxide/acetonitrile). Matrix effects were determined using two types of quantitation methods, namely the calibration curve method and the standard addition

method. The calibration curves were constructed by plotting the peak area against the concentration of pteridine standards. The calibration equations were calculated using linear regression analysis. Each concentration was measured in triplicate. For the standard addition method 25 µL of the supernatant was put to each of the five 10 mL volumetric flasks. Then the standard solutions at concentration of 100 µg/mL for erythropterin and leucopterin, 10 µg/mL for isoxanthopterine and 1 µg/mL for biopterin, neopterine and xanthopterine were added in amounts of 0, 25, 50, 75 and 100 µL. Finally, each flask was made up to the mark with acetonitrile and mixed well. After measuring the response for a series of standard additions, a plot of analytical signals versus concentrations of added analytes was plotted. The concentration of the analytes was determined from the point, at which the extrapolated line crossed the concentration axis at zero signal.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of mass spectrometric detection

Selected reaction monitoring conditions were established for each analyte by an infusion of standards (1 µg/mL) into the ion source by a syringe pump. The precursor ions were optimized-scanned with the second quadrupole for the best fragmentor voltage. The mass spectra of the molecules were recorded by the employment of fragmentor potentials between 50 and 200 V. After choosing the most intense fragmentor voltage for the found precursor ions, the collision energies of the ion transitions were optimized between 0 and 100 V using a product ion scan. The resultant values are listed in Table 1. To maximize the signals in the SRM mode the ion source parameters were tuned. The ion source was finally set as follows: gas temperature: 350 °C, gas flow: 10 L/min, sheath gas

Table 1

SRM conditions used for LC-MS/MS determination of the pteridines (ESI, positive mode (+), negative mode (–)). The first transition is used for quantitation and the second one for confirmation.

Compound	Molecular weight	Precursor ion	Product ion	Fragmentor (V)	Collision energy (V)
Biopterin	237.1	238.1 (+)	178.1	115	17
		236.1 (–)	192.1	140	3
Erythropterin	265.1	266.1 (+)	220.1	110	8
		264.1 (–)	192.1	95	6
Isoxanthopterine	179.1	180.1 (+)	135.1	125	20
		180.1 (+)	108.1	125	25
Leucopterine	195.1	196.1 (+)	140.1	120	16
		194.1 (–)	166.1	130	8
Neopterine	253.2	254.2 (+)	206.2	115	14
		254.2 (+)	236.2	115	8
Xanthopterine	179.1	180.1 (+)	135.1	125	20
		180.1 (+)	108.1	125	25

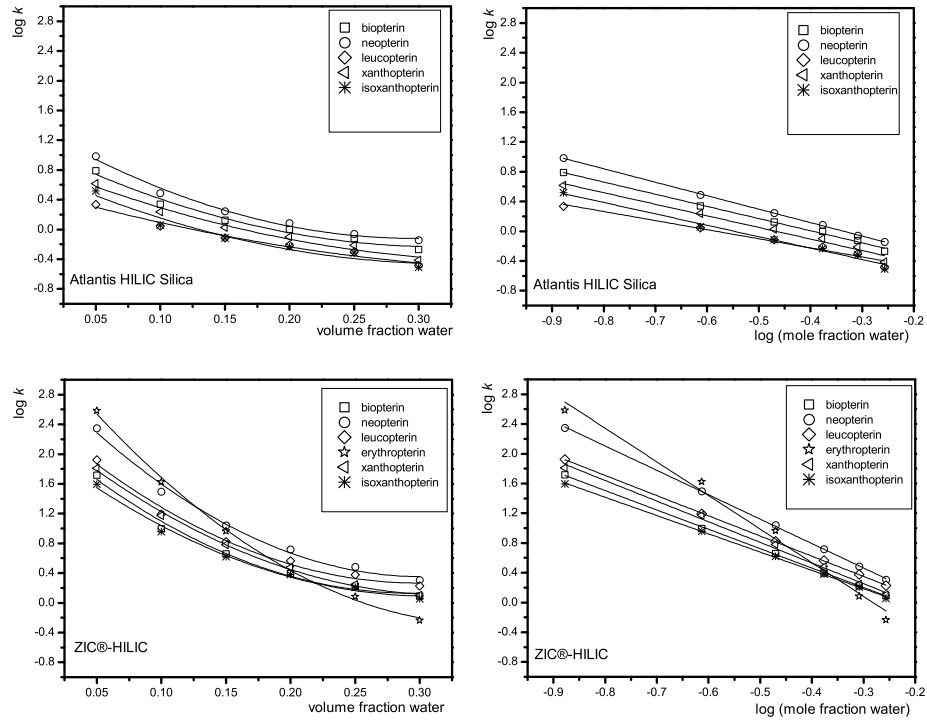


Fig. 2. Dependences of $\log k$ of studied pteridines on the volume fraction of water (second order polynomial fit) and on the logarithm of the mole fraction of water (linear fit) obtained for the both tested columns (for more details see Eqs. (1) and (2) in Section 3.2). The aqueous part of the mobile phase: 1 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00.

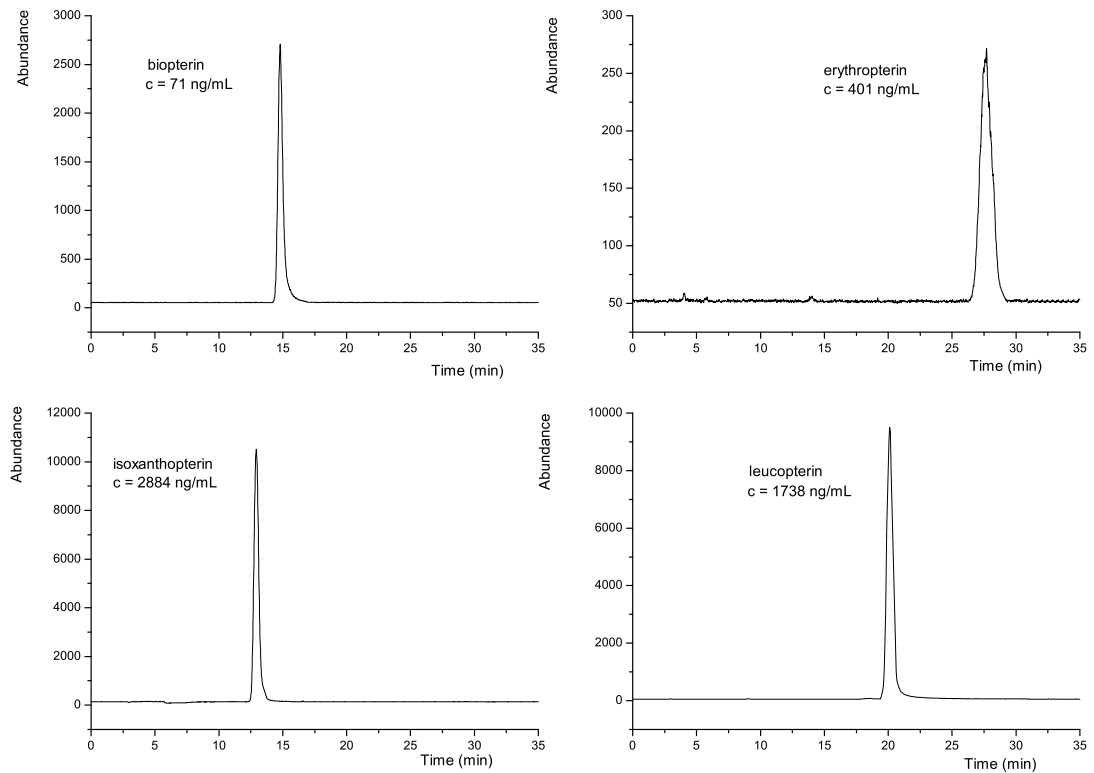


Fig. 3. SRM chromatograms of the orange form of *Graphosoma semipunctatum* under optimized LC-MS/MS conditions; for details see the Section 2 and Table 1.

Table 2

Parameters of the calibration curves (standard deviations in parentheses), limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) obtained for the optimized separation and mass spectrometric detection conditions.

Compound	Slope (mL/ng a.u.)	Intercept (a.u.)	Correlation coefficient	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Biopterin	1845.9 (65.4)	−1025.2 (89.9)	0.9991	0.1	0.3
Erythropterin	98.0 (5.6)	−49.3 (3.2)	0.9998	6.2	19.3
Isoxanthopterine	122.0 (7.6)	−245.5 (44.2)	0.9982	4.3	12.1
Leucopterine	400.7 (21.8)	−180.5 (32.8)	0.9975	1.4	3.8
Neopterine	304.5 (9.2)	−245.5 (45.6)	0.9986	0.4	1.3
Xanthopterine	448.2 (11.3)	−49.3 (3.3)	0.9977	1.2	3.7

temperature: 350 °C, sheath gas flow: 10 L/min, nebulizer pressure: 310 kPa, capillary voltage: 4000 V for positive mode and 3500 V for negative mode, nozzle voltage: 500 V for positive mode and 600 V for negative mode.

3.2. Separation of pteridines

All studied pteridines are highly hydrophilic molecules, which can be separated in HILIC. The significant effect on retention and thereby separation of pteridines on both columns was observed by changing the ACN/aqueous buffer ratio in the mobile phase. On Atlantis HILIC Silica column erythropterin exhibited a very broadened chromatographic zone and therefore, these data are not included in the results.

The series of measurements performed during the optimization of the mobile phase composition were also used for the characterization of the interaction mechanism involved in the separation system. When the logarithm of the retention factor of an analyte is plotted against the volume fraction of the aqueous part of the mobile phase the empirical Eq. (1) proposed by Schoenmakers et al. [53] should provide a description of the partitioning mechanism:

$$\log k = A\varphi^2 + B\varphi + C \quad (1)$$

where φ is the volume fraction of the water in the mobile phase.

A linear plot of $\log k$ vs. \log (mole fraction water) can indicate the adsorption process, according to the Snyder–Soczewinski expression:

$$\log k = \log k_w - \frac{A_s}{n_w} \log N_w \quad (2)$$

where k_w is the hypothetical retention factor when the mobile phase is purely aqueous, A_s and n_w are the cross-sectional areas occupied by the solute molecule and the water molecules on the surface, respectively, and N_w is the mole fraction of water in the eluent [54].

Fig. 2 shows the dependences of $\log k$ of pteridines plotted against the volume fraction of water and against the logarithm of the mole fraction of the water for the both columns. Fitting dependences of $\log k$ on the volume fraction of water according to Eq. (1) provide correlation coefficients over 0.9947 for both columns for all the studied pteridines. Dependences of $\log k$ on the logarithm of the mole fraction of water fit very well with the linear regression curve of Eq. (2), with correlation coefficients ranged from 0.9905 to 0.9992 for Atlantis HILIC Silica column and from 0.9960 to 0.9991 for ZIC®-HILIC column for all the studied analytes. Based on these observations both partitioning and adsorption seem to contribute to the retention mechanism on both columns.

For mass spectrometric detection, substantially lower concentrations of additives have to be used in order to prevent signal suppression. The effect of buffer concentration on the retention of pteridines was tested in the mobile phase, consisting of

Table 3

Accuracy and precision of the method for LC–MS/MS determination of the pteridines ($n=5$).

Concentration (ng/mL)	Intra-day ($n=5$) Measured concentrations (ng/mL) (mean \pm SD)	RSD (%)	RE (%)	Inter-day ($n=5$) Measured concentrations (ng/mL) (mean \pm SD)	RSD (%)	RE (%)
Biopterin						
10	9.53 \pm 0.42	4.40	−4.73	9.61 \pm 0.37	3.85	−3.93
1000	961.70 \pm 10.38	1.07	−3.83	956.80 \pm 9.28	0.97	−4.32
2500	2346.50 \pm 91.28	3.90	−6.14	2317.00 \pm 76.92	3.32	−7.32
Erythropterin						
20	20.75 \pm 1.31	6.31	3.73	20.84 \pm 1.25	5.99	4.21
2500	2570.75 \pm 108.74	4.23	2.83	2572.00 \pm 95.94	3.73	2.88
5000	5446.50 \pm 431.36	7.92	8.93	5481.50 \pm 443.45	8.09	9.63
Isoxanthopterine						
20	20.97 \pm 0.91	4.34	4.83	20.87 \pm 0.89	4.26	4.33
2500	2598.00 \pm 76.38	2.94	3.92	2609.50 \pm 37.05	1.42	4.38
5000	5368.50 \pm 339.31	6.32	7.37	5344.50 \pm 311.05	5.82	6.89
Leucopterine						
20	20.27 \pm 0.65	3.20	3.66	20.48 \pm 0.87	4.25	2.38
2500	2425.25 \pm 51.90	2.14	−2.99	2598.25 \pm 50.93	1.96	3.93
5000	4708.50 \pm 232.60	4.94	−5.83	4809.00 \pm 275.56	5.73	−3.82
Neopterine						
20	19.63 \pm 0.24	1.22	−1.85	20.62 \pm 0.27	1.31	3.10
2500	2594.25 \pm 20.49	0.79	3.77	2607.25 \pm 26.33	1.01	4.29
5000	5219.00 \pm 167.53	3.21	4.38	4808.50 \pm 163.97	3.41	−3.83
Xanthopterine						
20	21.34 \pm 1.26	5.90	6.72	20.76 \pm 0.89	4.29	3.81
2500	2649.75 \pm 91.15	3.44	5.99	2624.50 \pm 137.26	5.23	4.98
5000	5453.00 \pm 397.52	7.29	9.06	5354.50 \pm 332.51	6.21	7.09

SD, standard deviation; RSD, relative standard deviation; RE, relative error.

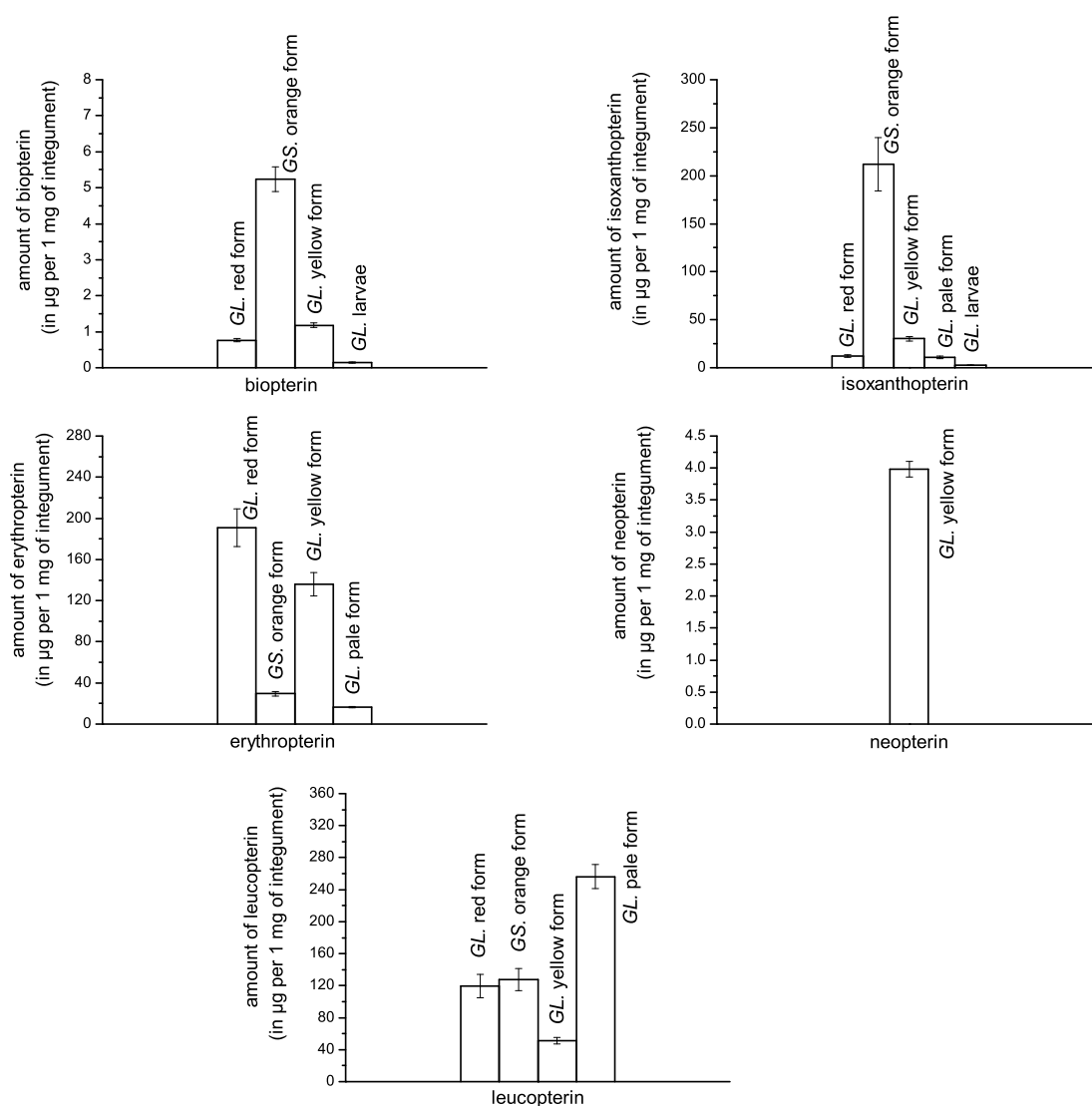


Fig. 4. Comparison of the amounts of pteridines found in different forms of *Graphosoma lineatum* (GL) and *Graphosoma semipunctatum* (GS).

ACN/ammonium acetate, pH 6.8 85/15 (v/v). With increasing buffer concentration the retention of pteridines slightly increased, which can be related to hydrophilic partitioning [55]. Presumably, high concentrations of organic solvent in the mobile phase cause salt partition preferentially into the water-rich layer on the stationary phase. The presence of solvated ions in this water-rich layer would increase its volume, potentially leading to stronger retention of polar solutes [55]. The ZIC®-HILIC column demonstrated a great deal of salt concentration on retention of erythropterin, where an increasing salt concentration from 1 to 25 mM increased its retention from $k=2.85$ to $k=23.72$. It can also be related to the suppression of repulsive electrostatic interactions between the sulfonate groups of sulfobetaine ligands and carboxyl group of erythropterin.

The effect of buffer pH on the retention and separation of pteridines was tested in the mobile phase composed of ACN/5 mM ammonium acetate 85/15 (v/v) in the range of 4–6 and 4–8 for Atlantis HILIC Silica column and ZIC®-HILIC column, respectively. On Atlantis HILIC Silica column only slightly increasing retention

of pteridines was observed with increasing buffer pH, probably due to attraction of cationic solutes to gradually dissociating silanol groups at higher pH. No influence of pH on pteridine retention has been observed on ZIC®-HILIC column containing permanent zwitterionic sulfobetaine ligands. Replacing ammonium acetate buffer with ammonium formate buffer caused a marked deterioration of peak shapes. Additions of acetic acid or formic acid as an aqueous part of the mobile phase within the range of 0.001–0.1% caused a peak tailing of the pteridines on the Atlantis HILIC Silica column.

Based on these results, the ZIC®-HILIC column was chosen for the analysis of pteridines. The optimized composition of the mobile phase, with respect to yielding sufficient retention of polar analytes (retention factor >1), acceptable resolution of pteridines ($R_s > 1$), satisfactory peak shapes ($0.9 < A_s < 1.2$) and a sufficient detection sensitivity for all the analytes, was found to be ACN/5 mM ammonium acetate, pH 6.80, 85/15 (v/v). Under these conditions pteridines eluted with the following retention factors: isoxanthopterin $k=4.18$, biopterin $k=4.57$, xanthopterin $k=5.99$, leucopterin $k=6.62$, erythropterin $k=9.16$ and neopterin $k=11.03$.

3.3. Quantitation

Two calibration approaches were used for determining pteridines in the red form of *G. lineatum*, namely calibration curve method and standard addition method. Results gained from both methods were statistically compared and the matrix effect was evaluated. Calibration curve method is most convenient when a large number of similar samples can be analyzed. The results of the weighted linear regression of dependences of peak area on concentrations are listed in Table 2. The high correlation coefficients indicate an excellent linearity. Testing at a significance level of $1 - \alpha = 0.95$ demonstrates that the computed intercepts are significantly different from zero. The peak height vs. concentration dependences were treated by linear regression, to determine the limits of detection and quantitation, as the three- and ten-times the noise level, respectively.

Standard addition method is useful when the analyte is present in a complex matrix and matrix-matched calibration samples are not available. This method was tested on the sample of the red form of *G. lineatum*.

Lord's test was used for testing the conformity of the two sets of analytical results. No statistically significant difference was observed among the results obtained by the calibration curve method and the standard addition method. The results showed that ion suppression or enhancement from sample matrix was negligible under the applied conditions. Therefore, only the calibration curve method was used for the determination of pteridines in real samples.

3.4. Selectivity and carry over effect

Selectivity was verified by inspecting chromatograms of real samples in MS scan mode. These chromatograms did not contain any interfering compound at the retention times of the studied pteridines. Sample carry-over was verified by visual inspection of the chromatograms of the injected blank. No carry-over effect was observed at concentrations of pteridines <1000 ng/mL. For standards of pteridines at concentration of 5000 ng/mL the carry-over was found at 5% but it was eliminated during the following blank injection. Therefore, a blank injection was inserted between each unknown sample in order to prevent the carry-over effect.

3.5. Precision and accuracy

Intra-day and inter-day accuracy and the precision of the developed method were assessed by determining standards at three concentration levels in five replicates. The accuracy was expressed as the relative error (RE) and the precision expressed by repeatability as the relative standard deviation (RSD). The data determined for the studied pteridines are summarized in Table 3. For the three concentrations of pteridines, the inter- and intra-day precisions (RSD%) ranged from 0.79 to 8.09%, and accuracy (RE%) was within $\pm 9.63\%$. The results indicate that the newly developed method has an acceptable accuracy and precision for the analysis of pteridines.

3.6. Analysis of pteridines in *G. lineatum* and *G. semipunctatum*

The optimized LC–MS/MS method was used for determining the selected pteridines into four forms of *G. lineatum*, namely larvae, pale, red, and yellow adult forms; and orange adult form of *G. semipunctatum*. Dimethyl sulfoxide was used for the extraction of pteridines from the insect integuments. The extraction time was 96 h (for sample preparation see the Section 2). For illustration, the SRM chromatograms of the orange form of *G. semipunctatum* are given in Fig. 3. Obtained results of the analysis of pteridines in different forms of *G. lineatum* and *G. semipunctatum* are summarized

in Fig. 4. It is evident that xanthopterin was not found in any studied form. Neopterin was found only in the yellow form at a concentration of 4 μg per 1 mg of integument. Isoxanthopterin was the only pteridine present in all forms of *G. lineatum* and *G. semipunctatum*. Based on the results, it is obvious that larvae of *G. lineatum* contains only a small amount of biopterin and isoxanthopterin, whereas the pale adult form contains mainly leucopterin and isoxanthopterin and erythropterin are minor. Red and yellow forms of *G. lineatum* as well as the orange form of *G. semipunctatum* contain different proportions of pteridines resulting in the characteristic coloration. The results show big differences in the distribution of individual pteridines and their relative amounts among the individual forms.

4. Conclusion

This work expands the application of HILIC separation combined with MS detection. A new, simple and sensitive method employing hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry was developed and validated for the identification and determination of six pteridines which can be present in insect integuments.

The study also contributed to a better understanding of HILIC separations because the retention of pteridines was investigated in detail on two HILIC columns and the effects of the mobile phase composition, acetonitrile/buffer ratio, buffer type, concentration and pH value were examined. The retention of pteridines was affected mainly by the acetonitrile content in the mobile phase. The obtained results indicated a multimodal retention mechanism on both tested columns. The ZIC®-HILIC column provided stronger retention of pteridines and higher selectivity and efficiency of separation than Atlantis HILIC silica.

Under optimized LC–MS/MS conditions, four forms of *G. lineatum* and one form of *G. semipunctatum* were analyzed. The results showed that different forms of *Graphosoma* species can be characterized by different distributions of individual pteridines. This fact affects the coloration of various forms.

Acknowledgements

The financial support of the Grant Agency of the Czech Republic project P505/11/1459, project SVV 267215 and project no. 18213 of Charles University in Prague and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic project MSM0021620857 is gratefully acknowledged. The authors want to express their gratitude to Radek Socha (Entomological Institute, Academy of Science, Czech Republic) for providing the erythropterin standard. The material of bugs from Stockholm was collected by Aleksandra Johansen (Department of Ecology, University of Stockholm), from Sardinia by Jana Binderová (Department of Zoology, Charles University, Prague).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.05.004>.

References

- [1] I. Bel, M. Porcar, R. Socha, V. Nemec, J. Ferre, Arch. Insect Biochem. Physiol. 34 (1997) 83.
- [2] R. Harmsen, J. Exp. Biol. 45 (1966) 1.
- [3] A.C. Nichol, K.G. Smith, D.S. Duch, Annu. Rev. Biochem. 54 (1985) 729.
- [4] H. Rembold, in: R.L. Blakeley, S.J. Benkovic (Eds.), Foliates and Pterins, John Wiley Press, New York, 1985, p. 155.
- [5] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, Phys. Rev. Lett. 78 (1997) 1667.

- [6] D. Fuchs, A. Kramer, R. Reibnegger, E.R. Werner, M.P. Dierich, J.J. Goedert, H. Wachter, *Infection* 19 (1991) 98.
- [7] B. Stea, R.M. Halpern, B.C. Halpern, R.A. Smith, *Clin. Chim. Acta* 113 (1981) 231.
- [8] F. Han, B.H. Huynh, H. Shi, B. Lin, Y. Ma, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1265.
- [9] M.M. Muller, H. Curtius, M. Herold, C.H. Hubert, *Clin. Chim. Acta* 201 (1991) 1.
- [10] A.E. Mansilla, I.D. Meras, F. Salinas, *Chromatographia* 53 (2001) 510.
- [11] R.F. Chapman, in: S.J. Sompson, A.E. Douglas (Eds.), *The Insects: Structure and Function*, The English Universities Press, London, 1966, p. 819.
- [12] V. Nemec, M. Breuer, A. de Loof, *Eur. J. Entomol.* 100 (2003) 19.
- [13] B.S. Tullberg, G. Camberale-Stille, T. Bohlin, S. Merilaita, *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62 (2008) 1389.
- [14] K. Svadova, A. Exnerova, P. Stys, E. Landova, J. Valenta, A. Fucikova, R. Socha, *Anim. Behav.* 77 (2009) 327.
- [15] A.I. Johansen, A. Exnerova, K. Hotova-Svadova, P. Stys, G. Camberale-Stille, B.S. Tullberg, *Ecol. Entomol.* 35 (2010) 602.
- [16] A.R. Katritzky, C.W. Rees, in: A.J. Boulton, A. McKillop (Eds.), *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Pergamon, New York, 1984, p. 990.
- [17] E.A. Flavall, E.M. Crone, G.A. Moore, S.P. Gieseg, *J. Chromatogr. B* 863 (2008) 167.
- [18] F. Canada-Canada, A. Espinosa-Mansilla, A. Munoz de la Pena, A. Mancha de Llanos, *Anal. Chim. Acta* 648 (2009) 113.
- [19] A. Espinosa-Mansilla, A. Munoz de la Pena, F. Canada-Canada, A. Mancha de Llanos, *Talanta* 77 (2008) 844.
- [20] K. Hyland, D.W. Howells, *J. Chromatogr.* 429 (1998) 95.
- [21] J. Tomandl, J. Tallova, M. Tomandlova, V. Palyza, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 674.
- [22] I.D. Meras, A.E. Mansilla, M.J.R. Gomez, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 201.
- [23] L. Novakova, I. Kaufmanova, R. Janska, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 765.
- [24] T.H. Walter, P. Iraneta, P. Capparella, *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 177.
- [25] R.E. Majors, *LC–GC N. Am.* 24 (2006) 16.
- [26] Z.G. Shi, Y.B. Wu, Y.B. Luo, Y.Q. Feng, *Chromatographia* 71 (2010) 761.
- [27] S.E. Gibbons, I. Stayton, Y. Ma, *Electrophoresis* 30 (2009) 3591.
- [28] Y. Ma, G. Liu, M. Du, I. Stayton, *Electrophoresis* 25 (2004) 1473.
- [29] S. Gamagedara, S. Gibbons, Y. Ma, *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 120.
- [30] P. Koslinski, R. Bujak, E. Daghir, M.J. Markuszewski, *Electrophoresis* 32 (2011) 2044.
- [31] L. Merlini, R. Mondelli, *Gazz. Chim. Ital.* 92 (1962) 1251.
- [32] L. Merlini, G. Nasini, *J. Insect. Physiol.* 12 (1966) 123.
- [33] R. Socha, V. Nemec, *Acta Entomol. Bohemoslov.* 89 (1992) 195.
- [34] R.I. Smith, H.S. Forest, *J. Insect. Physiol.* 15 (1969) 953.
- [35] R. Socha, V. Nemec, *Eur. J. Entomol.* 93 (1996) 525.
- [36] Ch. Melber, G.H. Schmidt, *Comp. Biochem. Physiol.* 108 (1994) 79.
- [37] C.C. Niva, M. Takeda, *Comp. Biochem. Physiol. B* 132 (2002) 653.
- [38] M. Porcar, I. Bel, R. Socha, V. Nemec, J. Ferre, *J. Chromatogr. A* 724 (1996) 193.
- [39] P. Kozlík, V. Simova, K. Kalikova, Z. Bosakova, D.W. Armstrong, E. Tesarova, *J. Chromatogr. A* 1257 (2012) 58.
- [40] M.A. Strega, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2439.
- [41] P. Jandera, *Anal. Chim. Acta* 692 (2011) 1.
- [42] A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177.
- [43] P. Jandera, J. Urban, V. Skerikova, P. Langmaier, R. Kubickova, J. Planeta, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 22.
- [44] Z. Hao, B. Xiao, N. Weng, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1449.
- [45] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 46.
- [46] T. Zhou, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 82.
- [47] F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1099 (2005) 1.
- [48] D.V. McCalley, U.D. Neue, *J. Chromatogr. A* 1192 (2008) 225.
- [49] A. Berthod, S.S.S. Chang, J.P.S. Kullman, D.W. Armstrong, *Talanta* 47 (1998) 1001.
- [50] T. Yoshida, *J. Biochem. Biophys. Methods* 60 (2004) 265.
- [51] B. Buszewski, S. Bocian, E. Dziubakiewicz, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1529.
- [52] P. Hemstrom, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784.
- [53] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 261.
- [54] L.R. Snyder, H. Poppe, *J. Chromatogr.* 184 (1980) 363.
- [55] R. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A. Finaru, C. Elfakir, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5939.

Supplementary data

Figure of *G. lineatum* and *G. semipunctatum*



Table

Amount of pteridines (expressed in μg of analyte per 1 mg of integument) in different forms of *Graphosoma lineatum* (GL.) and *Graphosoma semipunctatum* (GS.); relative standard deviations are in parentheses ($n = 3$).

Compound	GL. red form	GS. orange form	GL. yellow form	GL. pale form	GL. larvae
biopterin	0.77 (5.19)	5.24 (6.53)	1.18 (4.82)	-	0.14 (7.22)
neopterin	-	-	3.98 (3.14)	-	-
xanthopterin	-	-	-	-	-
isoxanthopterin	12.01 (11.23)	211.88 (13.21)	30.34 (8.09)	11.03 (11.28)	2.63 (9.02)
erythropterin	190.76 (9.65)	29.43 (6.86)	136.05 (8.33)	16.44 (4.99)	-
leucopterin	119.67 (12.11)	127.60 (10.76)	51.16 (7.38)	256.17 (5.92)	-

- not found

5 ZÁVĚR

Předkládaná dizertační práce je tvořena komentovaným souborem čtyř publikací, které vyšly v mezinárodních impaktovaných časopisech a které reflektují důležité trendy v moderní vysokoúčinné kapalinové chromatografii. První část dizertační práce se zabývá možností spojení miniaturizované kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí pro environmentální analýzu. Druhá, rozsáhlejší část dizertační práce, je zaměřena na hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii. Pro charakterizaci a porovnání několika rozdílných stacionárních fází v HILIC byl zvolen komplexní přístup, založený na jejich testování odlišnými chromatografickými způsoby. HILIC byla využita i pro vývoj HPLC-MS/MS metody určené ke stanovení vybraných pterinů v kutikule ploštic.

Získané výsledky mohou být shrnuty do následujících bodů:

- Byla vyvinuta nová, miniaturizovaná, vysokoúčinná separační metoda, využívající cLC-MS/MS, ke stanovení vybraných estrogenních polutantů ve vodách. Vývoj metody byl zaměřen na dosažení úplné separace všech pěti sledovaných estrogenů za minimalizace matričních efektů, které by ovlivňovaly ionizaci jednotlivých analytů. Optimalizovaný separační systém se skládal z kapilární kolony Zorbax SB C18 a mobilní fáze tvořené acetonitrilem a vodou, kdy obě složky obsahovaly 0,1% kyselinu mravenčí. Byla použita gradientová eluce. Celková doba analýzy nepřesáhla 18 minut. K zakoncentrování a přečištění vzorků byla použita SPE na kolonce Discovery DSC-18Lt s monomerně vázaným oktadecylem na silikagelu. S tímto systémem bylo dosaženo pro všechny studované analyty vysoké výtěžnosti extrakce pohybující se mezi 95 – 100 % s relativní směrodatnou odchylkou nižší než 7,2 %. Kombinací SPE s cLC-MS/MS bylo dosaženo velmi nízkých hodnot LOD (5 – 7 ng/l) a LOQ (10 – 25 ng/l). Nově vyvinutá cLC-MS/MS metoda s SPE byla úspěšně použita k analýze reálných vzorků vod z různých lokalit České republiky.
- Za použití vybraných modelových analytů (peptidů) byly porovnány tři HILIC stacionární fáze, silikagelová, silikagelová s vázaným nativním cyklofruktanem a silikagelová s vázaným isopropyl cyklofruktanem, z hlediska jejich separační

účinnosti a interakčních možností. Nejnižší separační účinnosti pro vybrané peptidy bylo dosaženo na koloně s nemodifikovanou silikagelovou stacionární fází. Vyšší separační účinnost a selektivitu poskytovaly cyklofruktanové stacionární fáze, přičemž nepatrně vyšší selektivitu vykazovala nativní cyklofruktanová stacionární fáze. Na všech třech testovaných stacionárních fázích byl prokázán multimodální retenční mechanismus. Podle Waltersova testu byl silanolový index pro všechny testované kolony srovnatelný. Nejnižší hydrofobicita byla prokázána pro stacionární fázi s nativním cyklofruktanem a nejvyšší pro silikagelovou stacionární fázi. Z LFER výsledků vyplývá, že v případě silikagelové stacionární fáze se při retenci a separaci uplatňují pouze interakce pomocí vodíkové vazby. Interakce na cyklofruktanových stacionárních fázích byly z kvalitativního hlediska shodné. Na retenčním mechanismu se podílely vodíkové interakce, dipolarita/polarizibilita a disperzní interakce. Bylo prokázáno, že derivatizací hydroxylových skupin silikagelové stacionární fáze polárními cyklofruktany může být zvýšena její separační účinnost a selektivita pro analýzu polárních látek v HILIC módu.

- Dvě amidové HILIC kolony, kolona XBridge™ Amide a kolona TSK gel Amide-80, byly porovnány z hlediska separačních a interakčních vlastností. Při separaci vybraných peptidů a nukleobází byl na obou kolonách prokázán multimodální retenční mechanismus. Vyšší separační účinnosti bylo dosaženo na koloně XBridge™ Amide, což je způsobeno zejména menší velikostí částic dané kolony. Na základě testů selektivity a LFER metody bylo zjištěno, že kolona TSK gel Amide-80 má větší schopnost interagovat pomocí vodíkových vazeb. Kolona TSK gel Amide-80 poskytovala vyšší retenci pro bazické látky, což ukazuje na větší uplatnění iontově-výměnných interakcí. Sledování vlivu teploty na retenci vybraných analytů neprokázalo zásadní rozdíl mezi testovanými kolonami. I když jsou si obě amidové separační kolony velmi podobné, provedené testy prokázaly jejich určitou rozdílnost vedoucí k poněkud odlišné retenci a separaci testovaných analytů.
- Nová metoda využívající hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií byla vyvinuta k analýze vybraných pterinů v kutikule ploštic (Heteroptera). Optimální separační podmínky byly následující: kolona ZIC-HILIC, mobilní fáze: acetonitril/5 mM octan amonný, pH = 6,80, 85/15 (v/v); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; MS/MS detekce v MRM módu. Tato

metoda byla validována a aplikována ke stanovení vybraných pterinů ve čtyřech formách *Graphosoma lineatum* a jedné formě *Graphosoma semipunctatum*. Bylo zjištěno, že jednotlivé formy obsahují rozdílné množství jednotlivých pterinů, což ovlivňuje jejich zbarvení.

SEZNAM PUBLIKACÍ

- I. **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.; Tesařová, E.; Coufal, P.; Čabala, R.: *Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples*; J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2127-2132.
- II. **Kozlík, P.**; Šimová, V.; Kalíková, K.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: *Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases*; J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65.
- III. Širc, J.; Kubínová, S.; Hobzová, R.; Stránská, D.; **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.; Mareková, D.; Holáň, V.; Syková, E.; Michálek, J.: *Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses*; Int. J. Nanomedicine 7 (2012) 5315-5325.
- IV. Matějčiek, P.; Uchman, M.; Lepšík, M.; Srnec, M.; Zedník, J.; **Kozlík, P.**; Kalíková, K.: *Preparation and separation of telechelic carborane-containing poly(ethylene glycol)s*; ChemPlusChem 78 (2013) 528-535.
- V. **Kozlík, P.**; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bosáková, Z.: *Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection applied for analysis of pteridines in two Graphosoma species (Insecta: Heteroptera)*; J. Chromatogr. B 930 (2013) 82-89.
- VI. Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Gilar, M.; Tesařová, E.: *Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns*; J. Sep. Sci. 36 (2013) 2421-2429.

- VII. Seydlová, G.; Fišer, R.; Čabala R.; **Kozlík, P.**; Svobodová, J.; Pátek M.: *Surfactin Production Enhances the Level of Cardiolipin in the Cytoplasmic Membrane of Bacillus subtilis*; BBA - Biomembranes 1828 (2013) 2370-2378.
- VIII. Krajíček, J.; **Kozlík, P.**; Exnerová, A.; Štys, P.; Bursová, M.; Čabala, R.; Bosáková, Z.: *Capillary electrophoresis of pterin derivatives responsible for the warning coloration of Heteroptera*; J. Chromatogr. A 1336 (2014) 94-100.

SEZNAM PŘEDNÁŠEK A PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ

Přednášky

- **Kozlík, P.;** Bosáková, Z.; Tesařová, E.: *Analýza estrogenních polutantů ve vodných vzorcích životního prostředí pomocí kapilární kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií po extrakci tuhou fází*; 2. ročník konference PGS studentů Ústavu pro životní prostředí; Česká republika, Praha, 25. 5. 2011.
- **Kozlík, P.:** *Vývoj analytické metody pro stanovení estrogenních polutantů ve vodách pomocí kapilární kapalinové chromatografie*; Zentiva, Česká republika, Praha, 29. 8. 2011.
- **Kozlík, P.;** Adamusová, H.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.: *Comparison of high performance liquid chromatography and capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for analysis of estrogen pollutants*; 7th International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”; Česká republika, Praha, 29. - 30. 9. 2011.
- **Kozlík, P.;** *Trojité kvadrupol QqQ 6460 na katedře analytické chemie*; Dny pokročilých technik ve Viničné 7 - Hmotnostní spektrometrie; Česká republika, Praha, 28. 06. 2012.
- **Kozlík, P.;** Bosáková, Z.: *Study of separation of selected pteridines in hydrophilic interaction liquid chromatography*; 8th International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”; Česká republika, Praha, 24. – 25. 9. 2012.
- **Kozlík, P.;** Kalíková, K.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.: *Characterization and comparison of cyclofructan and amide based stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography*; 9th International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”; Česká republika, Praha, 23. - 24. 9. 2013.
- **Kozlík, P.:** *Cyclofructan-based stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography*; Zentiva, Česká republika, Prague, 20. 2. 2014.

Plakátová sdělení

- **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.; Janečková, L.; Tesařová, E.; Coufal, P.; Čabala, R.: *Identification and quantification of selected estrogens in water matrix by capillary liquid chromatography with MS-MS detection*; 24th International Symposium on Microscale Bioseparations; Dalian, Čína, 18. - 22. 10. 2009.
- Bosáková, Z.; **Kozlík, P.**; Janečková, L.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Coufal, P.: *Application of HPLC-MS/MS with jet stream thermal gradient focusing for identification and quantification of estrogen pollutants in natural water samples*; 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; Boston, USA, 19. – 24. 6. 2010.
- Širc, J.; Munzarová, M.; Lhotka, M.; **Kozlík, P.**; Hobzová, R.; Michálek, J.: *Electrospun Nanofibers as Scaffolds: Morphology and Drug Delivery*; 23rd European Conference on Biomaterials; Tampere, Finsko, 11. – 15. 9. 2010.
- **Kozlík, P.**; Krajíček, J.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Bosáková, Z.: *HPLC-MS-MS Analysis of Pteridines in Graphosoma Lineatum by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*; 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; Budapešť, Maďarsko, 19. - 23. 6. 2011.
- **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.: *Kritické porovnání kapilární kapalinové chromatografie a klasické vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí pro analýzu estrogenních polutantů ve vodné matrici po extrakci tuhou fází*; 63. Sjezd chemiků; Vysoké Tatry, Slovensko, 5. – 9. 9. 2011.
- Adamusová, H.; Bosáková, Z.; **Kozlík, P.**; Hortová, K.: *Use of HPLC-MS/MS for monitoring of residual concentrations of 17 β -estradiol during mouse sperm capacitation in vitro*; Separation Science Europe 2011; Londýn, Velká Británie, 10. – 11. 10. 2011.

- **Kozlík, P.**; Kalíková, K.; Šímová, V.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.: *Study of separation of peptides on cyclofructan-based stationary phases in HILIC mode*; Advances in chromatography and electrophoresis 2012 and Chiranal 2012; Olomouc, Česká republika, 11. – 14. 6. 2012.
- Adamusová, H.; **Kozlík, P.**; Repko, P.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.: *HPLC enantioseparation and quantitation of FMOC-derivatized branched amino acids*; Advances in chromatography and electrophoresis 2012 and Chiranal 2012; Olomouc, Česká republika, 11. – 14. 6. 2012.
- Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Šímová, V.; Tesařová, E.: *Cyclofructan-based stationary phases in HILIC*; 24th International Symposium on Chirality (Chirality 2012); Fort Worth, Texas, USA, 10. – 13. 6. 2012.
- Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Gilar, M.; Tesařová, E.: *Characterization and comparison of Amide HILIC stationary phases*; 29th International Symposium on Chromatography; Torun, Polsko, 9. – 13. 9. 2012.
- Širc, J.; **Kozlík, P.**; Stránská, D.; Kubínová, Š.; Hobzová, R.; Michálek, J.: *Multilayer nanofibrous constructs with incorporated gentamicin for controlled drug release*; 14th Annual Conference Yucomat 2012; Herceg Novi, Černá Hora, 3. – 7. 9. 2012.
- **Kozlík, P.**; Krajiček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.: *Development of a hydrophilic interaction liquid chromatography method with tandem mass spectrometric detection for the analysis of pteridines in two Graphosoma species (Insecta: Heteroptera)*; 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; Amsterdam, Nizozemsko, 16. – 20. 6. 2013.
- Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Gilar, M.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: *Cyclofructan and amide based stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography*; 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; Amsterdam, Nizozemsko, 16. – 20. 6. 2013.

- Adamusová, H.; Bosáková, Z.; **Kozlík, P.**; Hortová, K.: *Monitoring of residual concentrations of 17 β -estradiol during mouse sperm capacitation in vitro by HPLC-MS/MS*; 9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods; Siófok, Maďarsko, 4. – 6. 9. 2013.
- Krajíček, J.; **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.: *Development of capillary zone electrophoresis for analysis of pterine derivatives in various kinds of bugs*; 20th International symposium on Electro- and Liquid Phase- separation techniques; Puerto de la Cruz, Tenerife, Španělsko, 6. - 9. 10. 2013.
- Bosáková, Z.; Krajíček, J.; **Kozlík, P.**; Čabala, R.: *Analysis of bug defensive chemistry by HILIC-MS/MS and SPME-GC-MS techniques*; 41th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; New Orleans, Louisiana, USA, 11. – 15. 5. 2014.

Příloha I

Proceedings of 7th ISC Modern Analytical Chemistry

Prague 2011

Comparison of HPLC and capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for analysis of estrogen pollutants

PETR KOZLÍK^a, HANA ADAMUSOVÁ^a, EVA TESAŘOVÁ^b, ZUZANA BOSÁKOVÁ^a

^aDepartment of Analytical Chemistry, ^bDepartment Physical and Macromolecular Chemistry,
Faculty of Science, Charles University in Prague,
Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic, ✉ kozlipet@centrum.cz

Keywords

estrogen pollutants
liquid chromatography
mass spectrometry

A relatively ubiquitous class of global environment pollutants are substances which affect the endocrine system of a wide spectrum of organisms [1, 2]. These substances, called endocrine disruptors, can mimic or antagonize functioning of steroid hormones, disrupt biosynthesis or metabolism of steroids or alter hormon receptor populations [1]. To the wide range of substances with endocrine-disrupting properties belong estrogens. It was reported that these compounds affect ecosystems, e.g., feminization of wild fishes living downstream from wastewater effluent [3, 4]. During the last decades, occurrence of testicular tumors and developmental defects of reproduction organs has increased in human population and the quality of human spermiogram has substantially deteriorated [5, 6]. The presence of estrogen pollutants, along with unhealthy lifestyle, may be one of the reasons. Typical representatives of endocrine disruptors are natural and synthetic hormones, such as 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, estriol, estrone, and the synthetic contraceptives 17 α -ethynylestradiol and mestranol. The estrogen concentrations in aqueous environmental samples are at nanogram per liter levels [7–11]. A sensitive, selective, and simple method to monitor these estrogens in water is therefore required.

The main aim of this study was to develop and optimize a method of high performance liquid chromatography and capillary liquid chromatography with tandem mass

spectrometric detection for the determination of selected estrogen pollutants, namely 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, estriol, estrone and 17 α -ethynylestradiol.

Standards of estrogens were purchased from Sigma-Aldrich. The HPLC experiments were performed using a Series 1200 Capillary Liquid Chromatograph and Series 1200 Liquid Chromatograph with a Triple Quad LC/MS 6460 tandem mass spectrometer (Agilent Technologies) with an electrospray ionization interface (ESI) and with an electrospray ionization interface using Agilent jet stream thermal gradient focusing technology (ESI-JT), which uses super-heated nitrogen to improve ion generation and desolvation, to get higher signal and reduced noise. The principle of ESI-JT is that super-heated nitrogen sheath gas surrounds the nebulizer spray increasing desolvation efficiency. More ions and fewer solvent droplets enter the sampling capillary resulting in higher signal/noise ratio. A Zorbax SB C18 capillary column (150 mm \times 0.5 mm, particle size 5 μ m, Agilent Technologies), Ascentis Express C8 fused core (4.6 mm \times 150 mm, particle size 2.7 μ m, Supelco) and SunFire C18 (4.6 mm \times 150 mm, particle size 5 μ m, Waters) were tested.

For the MS/MS operation, ESI and ESI-JT were evaluated for determination of estrogens in both positive and negative ion modes. The ESI positive ion mode was more effective for the ionization of these estrogens. MS/MS detection was performed in the selected reaction monitoring. Two most intense characteristic molecular fragments were selected by tuning the values of the fragmentor voltage (from 10 to 350 V) in selected ion monitoring mode and the collision energy (from 10 to 250 V) in product ion mode for each analyte. The optimized conditions for the mass spectrometer were as follows: capillary voltage 5500 V, nebulizer pressure 12 psi, gas temperature 350 $^{\circ}$ C, gas flow 10 L/min for capillary liquid chromatography; capillary voltage 5500 V, nebulizer pressure 45 psi, gas temperature 300 $^{\circ}$ C, gas flow 10 L/min for LC using ESI; capillary voltage 5000 V, nozzle voltage 2000 V, nebulizer pressure 35 psi, gas temperature 350 $^{\circ}$ C, gas flow 10 L/min, sheath gas flow 12 L/min, sheath gas temperature 400 $^{\circ}$ C for LC using ESI-JT.

In order to develop a miniaturized capillary liquid chromatography and HPLC procedures for determination of estrogen pollutants three separation columns were selected (see above). A binary mixture of acetonitrile and water, containing 0.1% formic acid was used as the mobile phase. The separation system was optimized under the conditions of isocratic elution. The effect of the acetonitrile content on the retention and separation of estrogens was studied within a range from 25 to 45 vol.%. The degree of ionization of all the five analytes in the positive ionization mode also was examined. The optimum composition of the mobile phase, with respect to attain satisfactory retention of the most polar analyte, estriol, acceptable resolution of all the estrogens and sufficient detection sensitivity, was found to be 38/62 (v/v) acetonitrile/water mixture containing 0.1% formic acid for capillary liquid chromatography using Zorbax SB C18

Table 1

Limits of detection in ng/mL obtained for estriol, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, 17 α -ethynylestradiol, and estrone, by capillary liquid chromatography using Zorbax SB C18 capillary column, HPLC using Ascentis Express C8 fused core with electrospray ionization interface (ESI) and electrospray ionization interface jet stream thermal gradient focusing technology (ESI-JT), and HPLC using SunFire C18 with ESI and ESI-JT.

Compound	Zorbax	Ascentis ESI	Ascentis ESI-JT	SunFire ESI	SunFire ESI-JT
estriol	0.68	0.59	1.72	1.21	1.95
17 β -estradiol	0.64	0.20	0.18	0.69	0.59
17 α -estradiol	0.52	0.20	0.10	0.67	0.32
17 α -ethynylestradiol	0.51	0.46	0.59	1.53	1.66
estrone	0.67	0.69	0.85	2.97	2.89

capillary column. The acetonitrile/water ratio (with 0.1% formic acid) had to be shifted to 40/60 (v/v) if Ascentis Express C8 fused core column or SunFire C18 column were used in HPLC. The time of analysis did not exceed 13 minutes by capillary liquid chromatography (flow rate 18 μ L/min), 10 minutes by HPLC using Ascentis Express C8 (flow rate 0.8 mL/min) and 25 minutes by HPLC using SunFire C18 (flow rate 0.8 mL/min). All the compounds were baseline resolved by HPLC using the both columns, the resolution of hardly separated 17 α - and 17 β -estradiol was poorer by capillary liquid chromatography.

Under the optimized MS/MS detection and separation conditions for each separation system, calibration curves were measured for all the five estrogens in a concentration range from 5 to 500 ng/mL, and the analytes were tested in a linearity range from limit of quantification of respective analyte to 500 ng/mL. Each measurement of the peak area was carried out in triplicate. The peak height versus concentration dependencies were treated by linear regression, to determine the limits of detection (Table 1) and limits of quantitation. The lowest limits of detection were achieved by HPLC using Ascentis Express C8 with ESI. The lowest baseline noise was achieved by ESI-JT but the signal of analytes was slightly suppressed in contrast to ESI.

The results clearly showed that the most suitable method for the analysis of estrogen pollutants was HPLC using Ascentis Express C8 column with ESI. The separation of the all studied estrogens is shown in Figure 1. The method provided good separation efficiency and very low limits of detection and the time of analysis did not exceed 10 minutes.

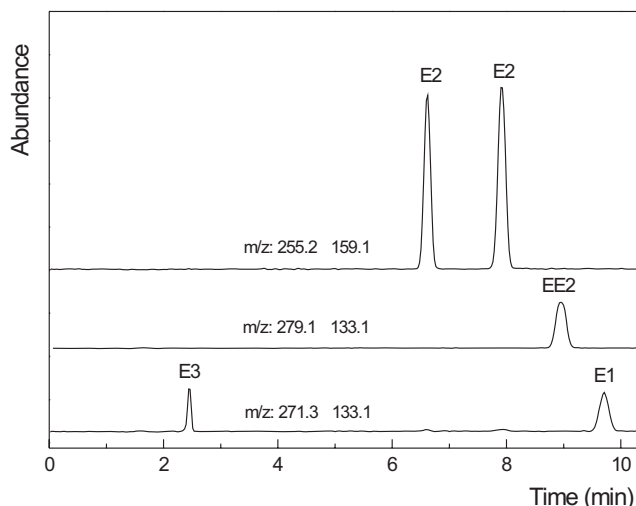


Fig. 1. Selected reaction monitoring chromatograms of 17 β -estradiol (β E2), 17 α -estradiol (α E2), estrone (E1), obtained by HPLC using Ascentis Express C8 with electrospray ionization interface (50 ng/mL). Mobile phase: 40/60 (v/v) acetonitrile/water mixture containing 0.1% formic acid, flow rate 0.8 mL/min. MS conditions: capillary voltage 5500 V, nebulizer pressure 45 psi, gas temperature 300 °C, gas flow 10 L/min.

Acknowledgments

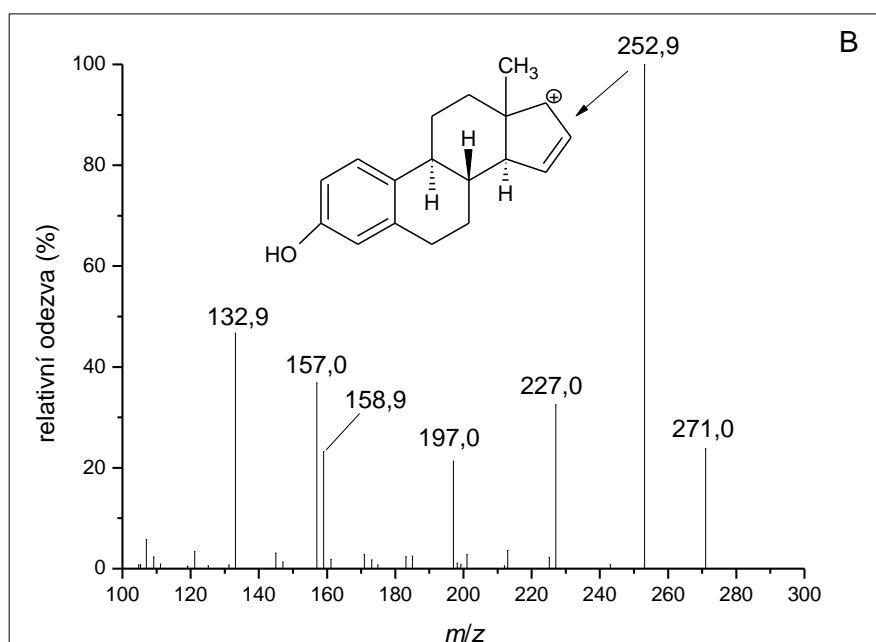
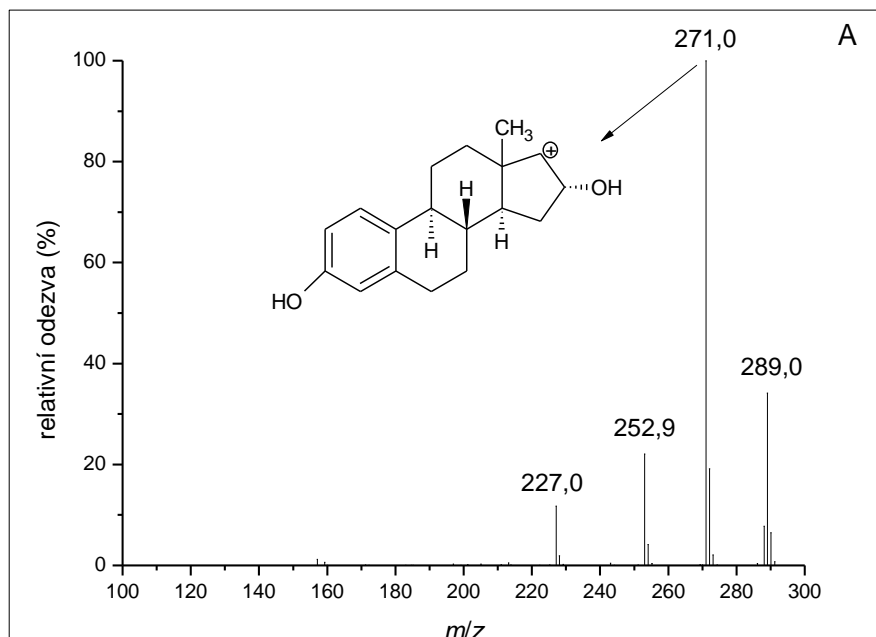
The financial support of the Grant Agency of Charles University in Prague, SVV 261204, the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project MSM0021620857, Centrum No. 1M06011, 285411 and RP 14/63 as well as the Norwegian Financial Mechanism, project CZ0116, is gratefully acknowledged.

References

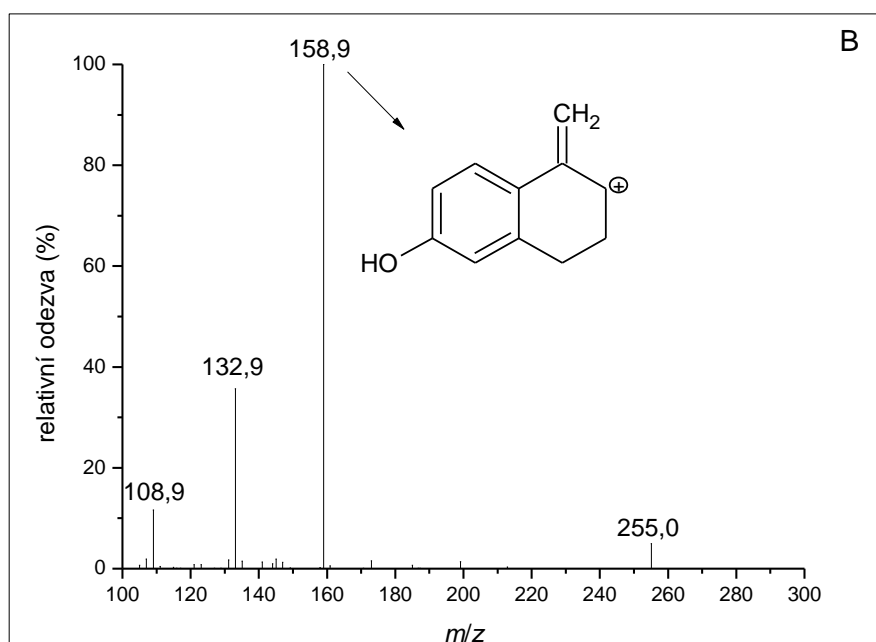
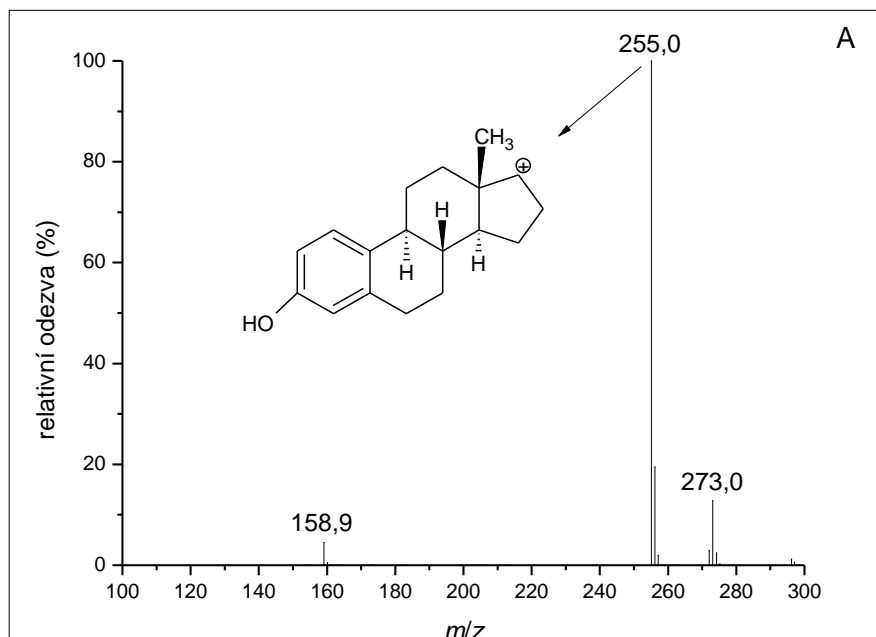
- [1] Pacáková V., Loukotková L., Bosáková Z., Štulík K.: *J. Sep. Sci.* **32** (2009), 867–882.
- [2] Kozlík P., Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P., Čabala R.: *J. Chromatogr. A* **1218** (2011), 2127–2132.
- [3] Sole M., Raldua, D., Piferrer F., Barcelo D., Porte C.: *Comp Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **136** (2003), 145–156.
- [4] Sumpter J. P.: *Toxicol. Lett.* **82–83** (1995), 737–742.
- [5] Eertmans F., Dhooze W., Stuyvaert S., Comhaire F.: *Toxicol. In Vitro* **17** (2003), 515–524.
- [6] Sharpe R. M.: *Phil. Trans. R. Soc. B* **365** (2010), 1697–1712.
- [7] Mitani K., Fujioka M., Kataoka H.: *J. Chromatogr. A* **1081** (2005), 218–224.
- [8] Nieto A., Borrull F., Pocurull E., Marce R. M.: *J. Chromatogr. A* **1213** (2008), 224–230.
- [9] Farre M., Kuster M., Brix R., Rubio F., De Alda M. J. L., Barcelo D.: *J. Chromatogr. A* **1160** (2007), 166–175.
- [10] Stuart J. D.: *Adv. Chromatogr.* **45** (2007), 245–273.

Příloha II

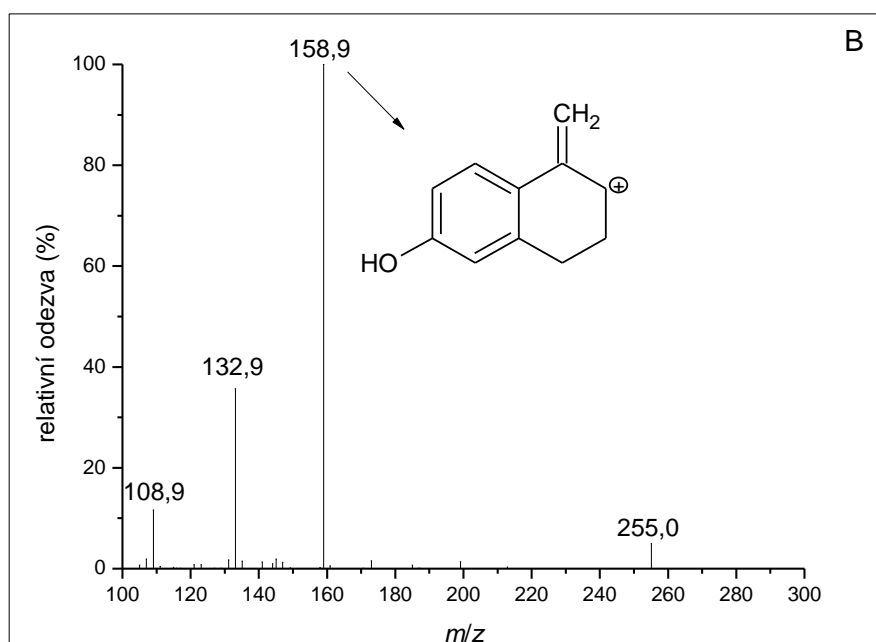
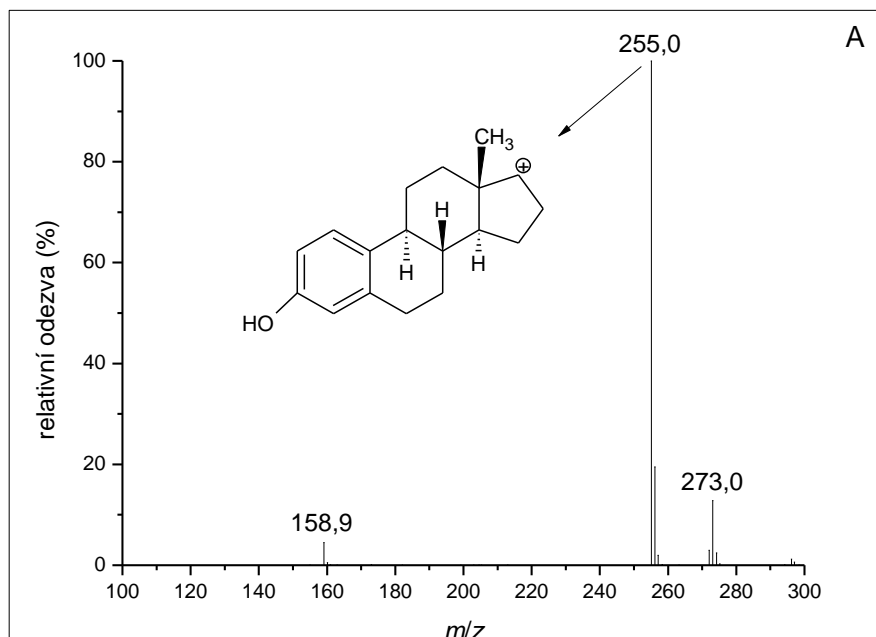
Hmotnostní spektra z MS skenu a skenu produktového iontu v pozitivním módu pro všechny studované analyty (struktury viz obr. 3.2) v publikaci I.



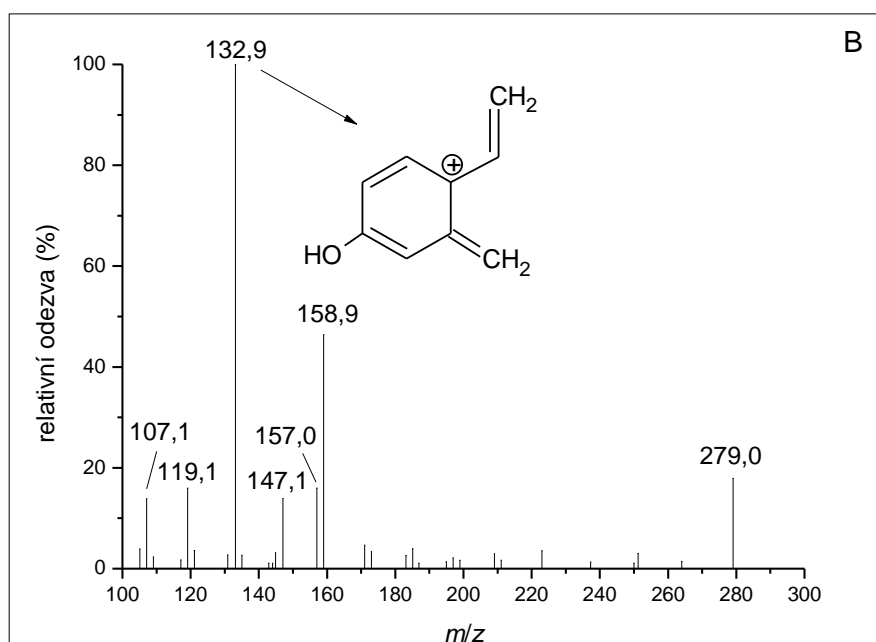
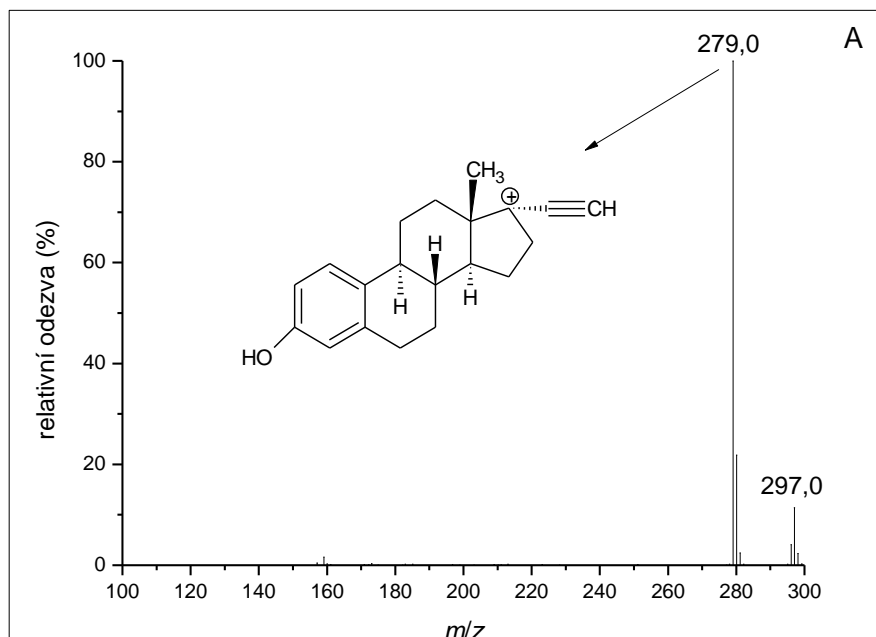
Obrázek 1 Hmotnostní spektra estriolu v pozitivním módu (methanolický standard o $c = 100 \text{ ng/ml}$): A) MS sken estriolu při napětí na fragmentoru 110 V; B) Sken produktového iontu vzniklého štěpením m/z 271,0 při kolizní energii 10 V.



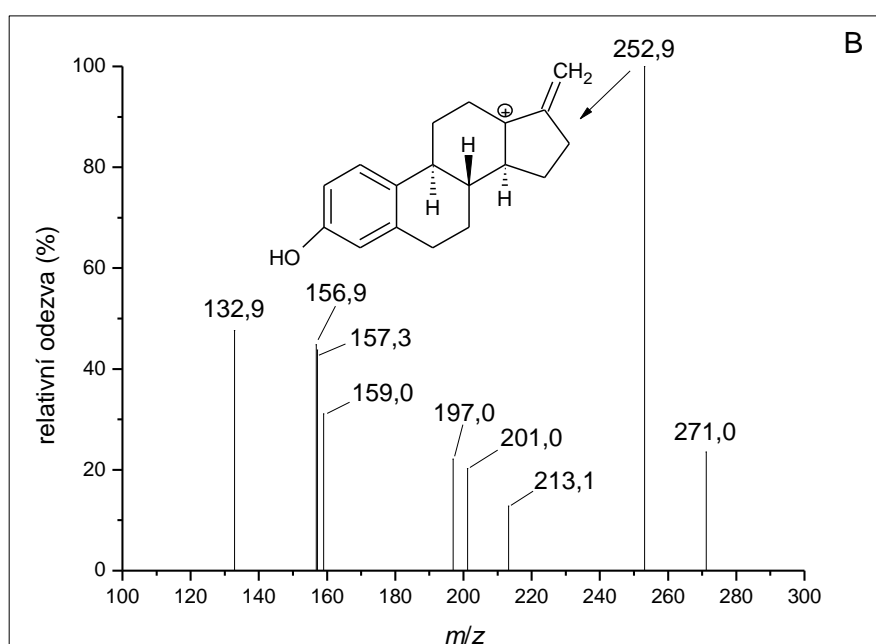
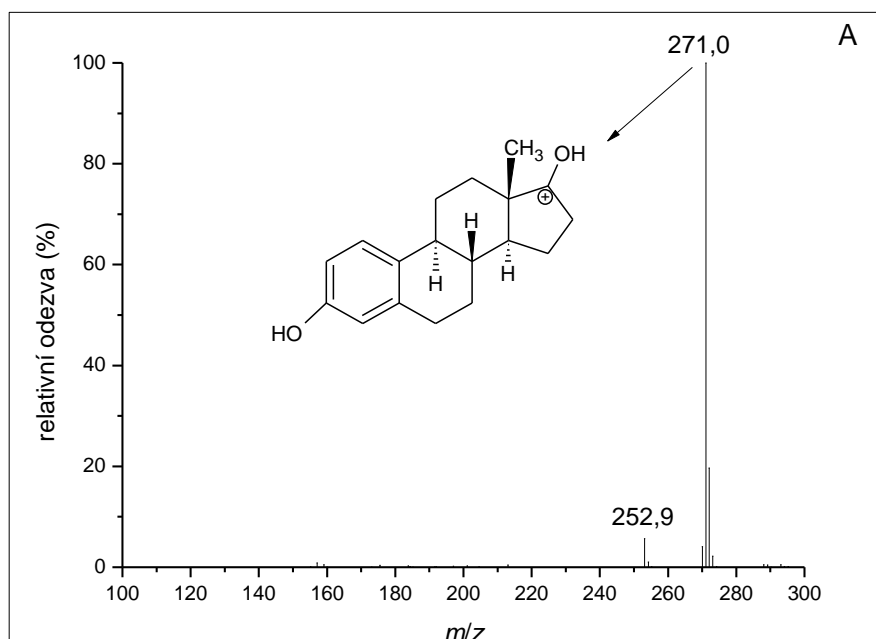
Obrázek 2 Hmotnostní spektra 17 α -estradiolu v pozitivním módu (methanolický standard o $c = 100$ ng/ml): A) MS sken 17 α -estradiolu při napětí na fragmentoru 120 V; B) Sken produktového iontu vzniklého štěpením m/z 255,0 při kolizní energii 15 V.



Obrázek 3 Hmotnostní spektra 17β-estradiolu v pozitivním módu (methanolický standard o c = 100 ng/ml): A) MS sken 17β-estradiolu při napětí na fragmentoru 120 V; B) Sken produktového iontu vzniklého štěpením m/z 255,0 při kolizní energii 15 V.



Obrázek 4 Hmotnostní spektra 17 α -ethynylestradiolu v pozitivním módu (methanolický standard o $c = 100$ ng/ml): A) MS sken 17 α -ethynylestradiolu při napětí na fragmentoru 120 V; B) Sken produktového iontu vzniklého štěpením m/z 279,0 při kolizní energii 10 V.



Obrázek 5 Hmotnostní spektra estronu v pozitivním módu (methanolický standard o $c = 100$ ng/ml): A) MS sken estronu při napětí na fragmentoru 100 V; B) Sken produktového iontu vzniklého štěpením m/z 271,0 při kolizní energii 10 V.